GENÉTICA

SÉPTIMA EDICIÓN


ANTHONY J. F. GRIFFITHS

JEFFREY H. MILLER

DAVID T. SUZUKI

RICHARD C. LEWONTIN

WILLIAM M. GELBART



McGRAW-HILL • INTERAMERICANA



GENÉTICA

Séptima Edición

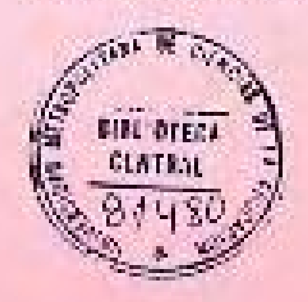
Anthony J. F. Griffiths
University of British Columbia

Jeffrey H. Miller
University of California, Los Angeles

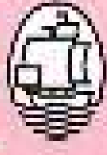
David T. Suzuki
University of British Columbia

Richard C. Lewontin
Harvard University

William M. Gelbart
Harvard University







McGRAW-HILL • INTERAMERICANA

MADRID • BUENOS AIRES • CARACAS • GUATEMALA • LISBOA • MÉXICO
NUEVA YORK • PANAMÁ • SAN JUAN • SANTAFÉ DE BOGOTÁ • SANTIAGO • SÃO PAULO
AUCKLAND • HAMBURGO • LONDRES • MILÁN • MONTREAL • NUEVA DELHI • PARÍS
SAN FRANCISCO • SYDNEY • SINGAPUR • ST. LOUIS • TOKIO • TORONTO

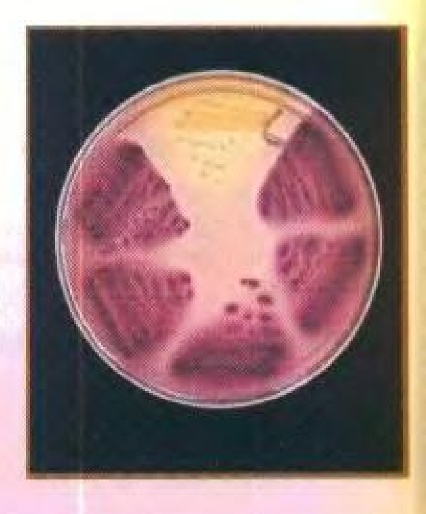
Contenido

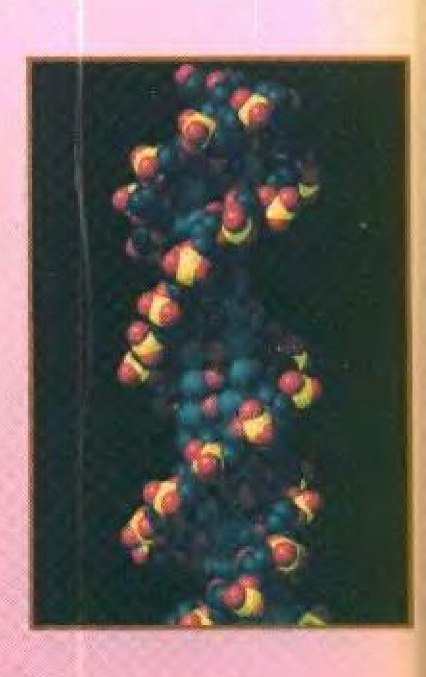


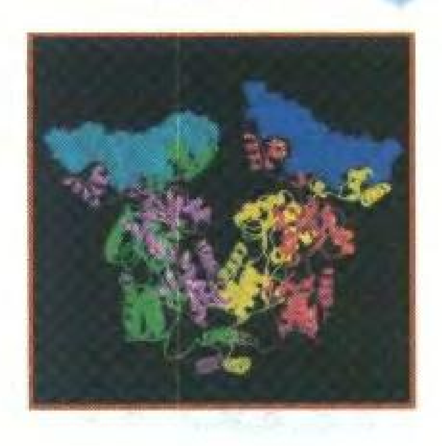










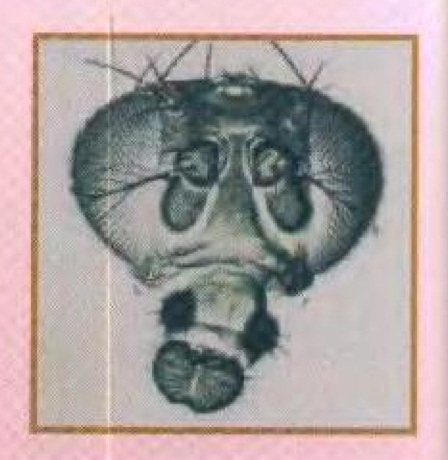


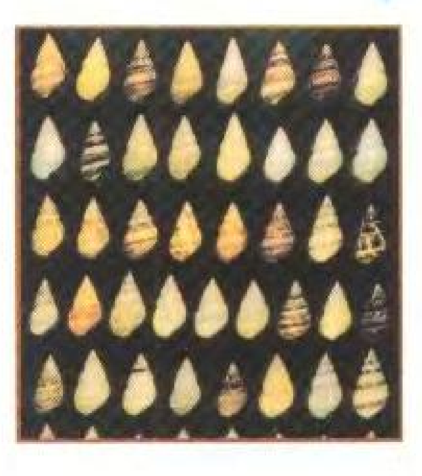




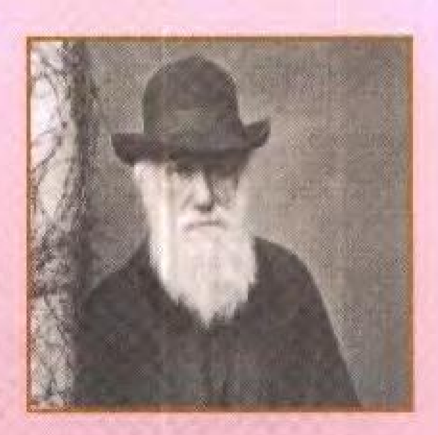












Prólogo

Genética y educación



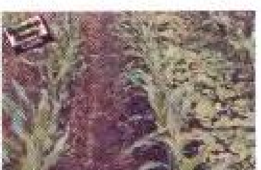




Figura 13-18

La Genética se ha convertido en fundamento indispensable de prácticamente cualquier clase de investigación relacionada con la Biología y la Medicina. Los trabajos científicos sobre diversos procesos biológicos, desde el ámbito molecular al de las poblaciones, emplean la «estrategia genética» para la comprensión de dichos procesos. Por lo tanto, resulta evidente que ningún estudiante de cualquier materia relacionada con las ciencias de la vida puede permitirse ignorar la ciencia de la Genética. La Genética ha alcanzado asimismo una situación prominente en los asuntos humanos. Se han obtenido tipos especiales de plantas, animales y microorganismos a partir de los cuales conseguimos alimentos, fármacos y otros muchos productos útiles. La Genética molecular constituye la base principal de la floreciente industria biotecnológica. En cuanto a su impacto sobre la opinión pública, la Genética nos enfrenta con un gran número de dilemas éticos, que aparecen regularmente en los medios de comunicación. Algunos ejemplos son los alimentos modificados genéticamente, la eugenesia, la confidencialidad sobre la información genética de los individuos y la pérdida de la diversidad genética en la naturaleza. Los estudiantes deben saber Genética como requisito para comprender estos asuntos y tomar decisiones razonadas sobre ellos. Por último, la visión novedosa que nos ofrece la Genética ha revolucionado de manera radical la percepción que los seres humanos tenemos del mundo: la forma en la que nos vemos a nosotros mismos en relación con otros organismos.

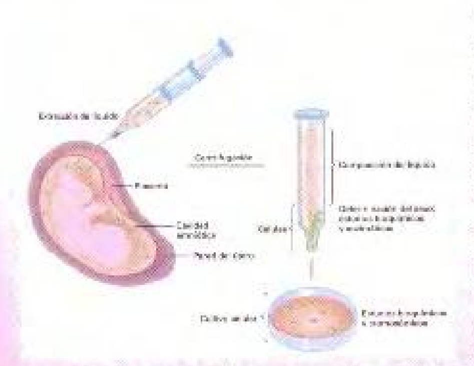


Figura 13-28

Un enfoque equilibrado para la enseñanza de la Genética

La importancia de la Genética es fruto de la poderosa combinación de los enfoques clásico y molecular. Cada uno de ellos tiene su propio poder: la Genética clásica (de los organismos) no tiene comparación posible en cuanto a su potencial para explorar territorios biológicos todavía no caracterizados; la Genética molecular resulta asimismo inigualable en su capacidad para desentrañar la naturaleza de los mecanismos celulares. Sería impensable enseñar una sin la otra, así que ambas reciben la debida atención en este libro. Provistos de ambos enfoques, los estudiantes pueden formarse una visión integrada de los principios de la Genética.

La conexión entre la Genética clásica y la molecular ha puesto siempre de relieve la existencia de un problema docente: ¿Cuál de las dos estrategias debe enseñarse al estudiante en primer lugar, la clásica o la molecular? En nuestra opinión, los estudiantes deben comenzar como lo hicieron los biólogos en los inicios del siglo XX, planteándose preguntas generales sobre las leyes que gobiernan la herencia. Por tanto, la primera parte del libro ofrece una visión más o menos histórica del armazón intelectual de la Genética clásica de los eucariotas. No obstante, cuando la ocasión lo requiere, se proporciona información sobre los aspectos moleculares. El conocimiento básico adquirido por nuestros alumnos y nuestros años de docencia han determinado que nos replanteemos la organización tradicional. En esta nueva edición, hemos introducido un notable tratamiento de la Genética molecular en los capítulos iniciales. De esta manera, se refuerza el conocimiento de los estudiantes sobre la estructura y la función del DNA, y se evita la presentación del gen como una abstracción. La segunda parte del libro hace hincapié en los detalles de la Genética molecular.



Figura 1-15

Énfasis en el análisis genético

Fiel a su título, el tema central del libro es el análisis genético. Esto se debe a nuestro convencimiento de que la mejor manera de entender la Genética es a través del aprendizaje sobre la forma en la que se realiza la inferencia genética. Prácticamente en cada una de las páginas del libro, se recrea un experimento trascendente de la Genética que fuerza a los estudiantes al análisis del resultado y a la extracción de conclusiones, como si ellos mismos hubieran sido los autores materiales. Este método de participación activa enseña a los estudiantes a pensar como científicos. Los modos de inferencia y las técnicas de análisis constituyen la base de las futuras exploraciones.

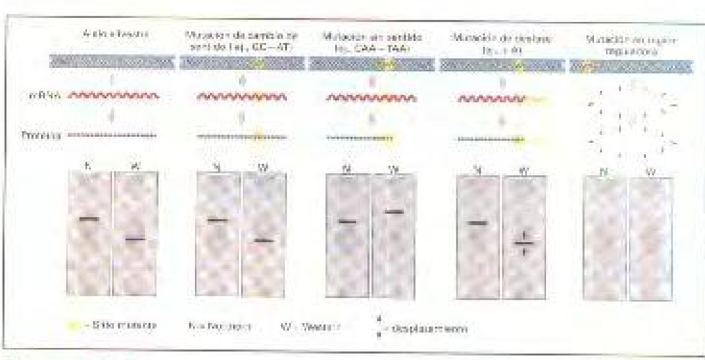


Figura 15-2

De igual forma, el análisis cuantitativo constituye el eje central del libro, ya que muchas de las nuevas ideas de la Genética tienen su fundamento en él, desde el concepto original del gen a técnicas tan actuales como la cartografía mediante SSLP. Los problemas que aparecen al final de cada capítulo proporcionan a los estudiantes la oportunidad de probar su nivel de comprensión con análisis cuantitativos que simulan de manera eficaz el trabajo práctico que se realiza en la Genética.

Ayudas al estudio

Se ha hecho un gran esfuerzo para animar a los estudiantes a que realicen trabajos prácticos, con el objetivo de mejorar sus capacidades analíticas y sus habilidades en la resolución de los problemas. En el libro se proporciona una amplia variedad de problemas resueltos y no resueltos, así como otros tipos de ayudas al estudio.

La sección de **Problemas** continúa siendo uno de los puntos fuertes del libro. Por lo general, los problemas están ordenados en función de la dificultad, de menor a mayor, indicándose con un asterisco aquellos que plantean un reto especial. Todos los problemas se han sometido a prueba con alumnos. Las soluciones de algunos problemas seleccionados se muestran al final del libro, y las de todos ellos, preparadas por Bill Fixsen (Harvard University), se pueden encontrar en el libro *Student Companion*.

54. Ciertas mutaciones recesivas en el nematodo *Caenorhabditis elegans* ayudan a entender la base de su sistema de locomoción. Estas mutaciones hacen que el gusano se mueva de forma ineficaz con rápidas oscilaciones, en lugar de su manera habitual de desplazamiento mediante deslizamiento. Presumiblemente, estas mutaciones afectan a los sistemas nervioso y muscular. Se cruzaron entre sí doce mutantes homocigóticos y se examinó a los híbridos de la F_1 para comprobar si oscilaban. Los resultados se muestran a continuación. Un signo más significa que el híbrido muestra fenotipo silvestre (deslizante), mientras que una «o» denota un fenotipo mutante oscilatorio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	o	+	−	−	o	+	+	+	+	+	+	+
2		o	+	+	+	o	+	o	+	o	+	+
3			o	o	−	+	+	+	+	+	+	+
4				o	−	+	+	−	−	+	+	+
5					o	+	+	−	+	+	−	+
6						o	+	o	+	o	−	+
7							o	+	+	+	o	o
8								o	+	o	+	−
9									o	+	+	+
10										o	+	+
11											o	o
12												o

a. Explique lo que se pretendía examinar con este experimento.

b. Utilice la misma lógica para asignar genotipos a cada uno de los 12 mutantes.

El problema paso a paso

Los capítulos suelen contener un ejercicio llamado el **Problema paso a paso**, en el que se plantea la resolución de un problema. Este ejercicio nació de la idea de que un problema de Genética representa únicamente la cima de un inmenso iceberg de conocimiento (y, de hecho, estuvimos considerando inicialmente la denominación de «problemas iceberg»). Un problema puede resolverse de manera constructiva tan sólo cuando se exponen los conocimientos teóricos subyacentes. Las actividades paso a paso facilitan el acceso a tales conocimientos sin que se proporcione la solución al problema. Algunas de las preguntas que se plantean en el ejercicio paso a paso podrían parecer triviales. No obstante, están dirigidas a menudo a solventar los errores en los conceptos fundamentales que impiden a los estudiantes la obtención de soluciones correctas.

La sección de problemas localizada al final de cada capítulo viene precedida de otra de **Problemas Resueltos**, que instruye sobre los métodos que utilizan los genetistas para la aplicación de sus principios a los datos experimentales. La investigación sobre la docencia de la ciencia demuestra que esta aplicación de los principios, que es un proceso natural para los profesionales, resulta un obstáculo importante para los estudiantes. La sección de problemas resueltos ofrece una demostración de este proceso mental y prepara a los alumnos para que resuelvan otros problemas por sí mismos.

PROBLEMAS RESUELTOS

El apartado de **Problema de Integración de Capítulos** está constituido por problemas resueltos que ponen énfasis en la integración de conceptos, tanto dentro de un mismo capítulo como entre diferentes capítulos. Estos problemas ayudan a mostrar la manera de estructurar conjuntamente los conocimientos aprendidos en cada sección y cómo éstos interactúan con los estudiados previamente. Asimismo, permiten que los estudiantes desarrollen una visión de conjunto conforme comienzan a organizar diversos conceptos en un cuerpo coherente de conocimiento.

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS





• Solución •

Ideas fundamentales

Si se combinan en una célula dos genomas haploides, cada uno de los cuales es portador de una mutación recesiva distinta, y el fenotipo resultante es mutante, las mutaciones deben estar en el mismo gen (mutaciones alélicas).

Si se combinan en una célula dos genomas haploides, cada uno de los cuales es portador de una mutación recesiva distinta, y el fenotipo resultante es silvestre, las mutaciones deben estar en genes diferentes.

Algunos heterocigotos muestran fenotipos que revelan la existencia de tipos de dominancia distintos a la dominancia completa.

Algunos alelos mutantes pueden causar la muerte del organismo.

La mayoría de los caracteres están determinados por series de genes que interaccionan entre ellos y con el medio ambiente.

Las interacciones alélicas provocan cambios en las proporciones monohíbridas.

Las interacciones génicas provocan cambios en las proporciones dihíbridas.

Las **Ideas fundamentales** al comienzo de cada capítulo resumen, con una prosa sencilla y evitando la terminología genética, los conceptos principales que se van a tratar en él. Proporcionan al lector una importante referencia pedagógica.

COROLARIO

La secuencia lineal de una proteína se pliega en una estructura tridimensional única. Este plegamiento genera sitios específicos a los que se unen los sustratos y en los que tiene lugar la reacción catalítica. La conformación tridimensional de una proteína, crucial para su función, está determinada sólo por su estructura primaria (secuencia lineal de aminoácidos). Por tanto, los genes pueden controlar la función de las enzimas mediante la determinación de la estructura primaria de las proteínas.

Los **Corolarios**, que se muestran en recuadros a lo largo de los capítulos, proporcionan referencias apropiadas para que el lector realice una pausa y medite sobre el material que acaba de leer.

RESUMEN

Los **Resúmenes** destilan de forma concisa el material de cada capítulo y refuerzan sus conceptos de manera inmediata. Todos estos apartados son de gran utilidad para repasar el texto, sobre todo durante la preparación de un examen.

> Ahora, trace un mapa de conceptos de este capítulo, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.
>
> genotipo / fenotipo / norma de reacción / medio ambiente / desarrollo / organismo

Al final de cada capítulo se pide al lector que cree un **Mapa de Conceptos**. Estos mapas surgieron del movimiento educativo constructivista, que asevera que el aprendizaje educativo es más efectivo cuando los nuevos datos se confrontan con los anteriores. El mapa de conceptos proporciona un método muy poderoso para la resolución de la mencionada confrontación y para la percepción gráfica de la integración de conceptos.

Nuevas características de la séptima edición

Nuevo énfasis en la integración de la Genética clásica y la molecular

La linealidad del proceso de la enseñanza implica que los conceptos deben introducirse uno a uno para no aturdir a los estudiantes. No obstante, la Genética es una materia integrada, en la que las manipulaciones de los organismos y de las moléculas van unidas de la mano. Por lo tanto, la integración constituye un aspecto fundamental en la enseñanza y un objetivo clave durante el aprendizaje. Siempre que resulta posible, desde los capítulos iniciales, esta edición integra los aspectos genéticos de los organismos y de las moléculas. El Capítulo 1 presenta los elementos básicos de la estructura y la función del DNA, utilizando el albinismo humano como ejemplo para establecer la relación entre DNA, genes, proteínas y fenotipos. El Capítulo 2 examina los patrones de herencia (tanto mendeliana como no mendeliana) y los explica molecularmente, empleando ejemplos como la PKU. La complementariedad existente entre las dos estrategias genéticas continúa con la exploración molecular de las interacciones genéticas, mostrándose los ejemplos del color de la flor en la planta Mary ojos azules y la anemia falciforme humana (Cap. 4).

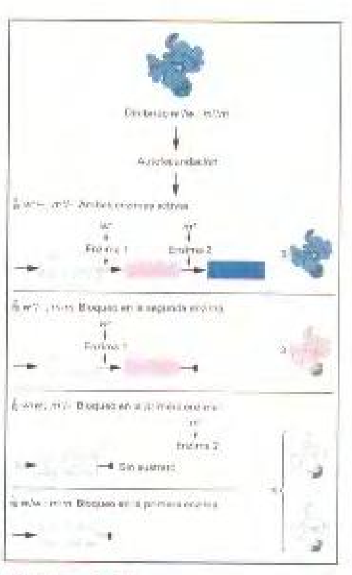


Figura 4-13

Nuevo orden de los capítulos para una mejor comprensión de los temas

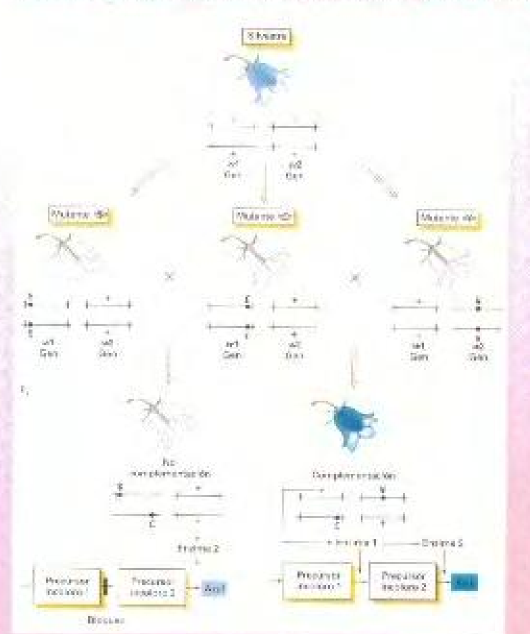


Figura 4-1

En nuestro objetivo de enfatizar mejor los postulados fundamentales de la Genética, hemos ubicado varios capítulos en una nueva posición. El libro consta ahora de seis bloques principales que agrupan los temas relacionados por principios comunes subyacentes: los aspectos generales de la herencia se exponen en los Capítulos 1-4; la recombinación y la cartografía de los genes en los Capítulos 5-7; la Genética molecular en los Capítulos 8-14; el cambio y la variación genética en los Capítulos 15-20; la Genética del desarrollo en los Capítulos 21-23, y el análisis genético de las poblaciones en los Capítulos 24-26.

Figura 3-28

Los beneficios de esta reorganización se pueden encontrar a lo largo de todo el texto. El Capítulo 2, por ejemplo, con objeto de recalcar los patrones generales de herencia, trata ahora tanto la Genética mendeliana como la herencia ligada al sexo. De forma similar, en el Capítulo 3, la incorporación de la estructura del genoma eucariótico junto a la base cromosómica de la herencia proporciona un reforzamiento mutuo de ambos principios. El nuevo título del Capítulo 4, Interacciones génicas, refleja la inclusión de material nuevo sobre la complementación y el nuevo énfasis en los postulados fundamentales sobre cómo interactúan los genes. El Capítulo 11 yuxtapone ahora la regulación de los genes en procariotas y eucariotas, de manera que se hacen patentes los principios comunes de ambos procesos. El Capítulo 23, Genética del desarrollo, incluye ahora el tratamiento de la regulación génica durante el desarrollo, un tema discutido previamente en un capítulo distinto.



Figura 11-37

Nuevas explicaciones perfeccionadas y simplificadas

En un esfuerzo por concentrar la atención en los principios fundamentales, hemos revisado el nivel de detalle de muchos capítulos y hemos escogido simplificar y perfeccionar la exposición de varios temas. Esto es particularmente evidente en el Capítulo 7 (Transferencia génica en bacterias y sus virus), el Capítulo 9 (Genética de la función del DNA), el Capítulo 16 (Mecanismos de la mutación génica), el Capítulo 19 (Mecanismos de la recombinación) y el Capítulo 21 (Genes extranucleares).

Dos nuevos capítulos y actualizaciones del texto

Se han introducido dos capítulos nuevos: el Capítulo 22, sobre el Cáncer como enfermedad genética, y el Capítulo 26, de Genética evolutiva. El Capítulo 22 presenta los mecanismos integrados que controlan la proliferación y la muerte celular, y lo que sucede cuando se interrumpen estos mecanismos. El Capítulo 26 trata el proceso evolutivo en función de la selección natural y de los factores aleatorios, e incluye secciones sobre la especiación y el origen de nuevos genes. Actualizaciones notables en el libro son: la puntuación Lod (Cap. 5); la replicación mediante el círculo rodante y la sintenia (Cap. 8); la Genómica funcional, que incluye el análisis por el doble híbrido de levadura, las micromatrices/*chips* de DNA y la regulación global (Cap. 14); los fundamentos moleculares de las reorganizaciones cromosómicas (Cap. 17); el DNA mitocondrial, el envejecimiento y determinadas enfermedades humanas (Cap. 21), y la muerte celular programada (Cap. 22).

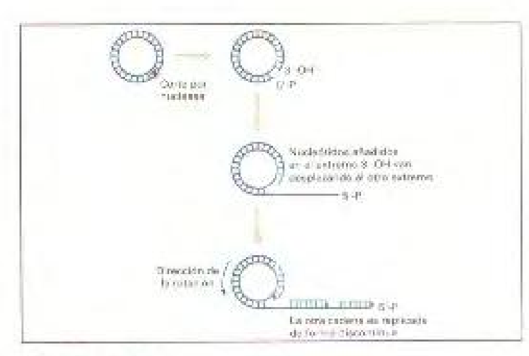


Figura 8-19

Problemas nuevos

Se han añadido más de 50 nuevos problemas, incluyendo muchos que implican análisis molecular.

Material suplementario

Este texto va acompañado del siguiente material suplementario (disponible sólo en inglés).

Solutions Manual
William Fixsen, Harvard University, 0-7167-3525-3
Contiene soluciones comentadas de todos los problemas del libro.

Introduction to Genetic Analysis CD-ROM
(formato híbrido para Windows y Macintosh)
Incluido con cada copia de la versión del libro en inglés, este CD contiene más de 30 animaciones originales que están disponibles en dos formatos. Las animaciones dan vida a las figuras del texto, incluyendo temas como la transcripción, la complementación y la replicación del DNA. Los estudiantes pueden visualizar cada animación como una serie ordenada de las ilustraciones que constituyen el proceso o como un vídeo completo.

Texto e imágenes aparecen reunidos, mostrando las figuras de los procesos genéticos que cobran vida como animaciones en el CD-ROM de Freeman Genetics.

Introduction to Genetic Analysis Web Site
W. H. Freeman y Sumanas, Inc., con contribuciones de William Sofer, The State University of New Jersey, Rurgers

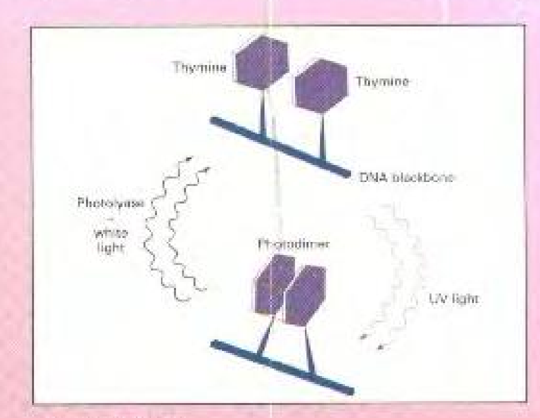


Figura 16-25

Este utensilio multimedia de enseñanza complementa y enriquece el libro. Disponibilidad en cada capítulo de instrumentos prácticos como las preguntas interactivas, las guías tuteladas, las tarjetas pedagógicas, las ideas fundamentales y el acceso a otras direcciones de internet, que ayudan a los estudiantes a repasar con vistas a un examen. Todas las imágenes del libro están disponibles para ser importadas. Esta dirección de internet, *www.whfreeman.com/iga/*, será puesta al día regularmente.

Essays on Genetics Education
Understanding Genetics: Ideas for Teachers
Anthony J. F. Griffiths y Jolie A. Mayer-Smith, ambos de la University of British Columbia
Esta publicación electrónica quincenal explora los problemas a los que se enfrentan los profesores de Genética, ofreciendo estrategias creativas y meditadas para fomentar el entendimiento de la Genética por parte de los estudiantes y el aprendizaje en general. Una colección completa de los ensayos está disponible a la venta.

Instructor Resource Manual and Test Bank
Sally Allen, University of Michigan, y Ewan Harrison
Impreso: 0-7167-3530X; CD ROM: 0-7167-3528-8
Contiene más de 700 preguntas de tipo test con múltiples respuestas alternativas, con las opciones verdadero-falso o en las que hay que responder emparejando distintos elementos. Contiene también ejemplos de exámenes completos y consejos para la enseñanza. Las versiones electrónicas (formatos para Windows y Mac, ambos disponibles en un CD) permiten que los profesores puedan importar las figuras, modificarlas, reorganizarlas y añadir otras en función de sus necesidades particulares.

Online Testing
Con Diploma, el paquete computarizado de preguntas de Brownstone Research Group, los profesores pueden confeccionar y modificar exámenes en papel, en una red de ordenadores y ahora, también, a través de Internet. Los profesores pueden incluir efectos multimedia, gráficos, películas y sonido en sus preguntas. Mecanismos de seguridad permiten a los profesores restringir las preguntas a ordenadores concretos o a tiempos definidos. El paquete incluye también una impresionante serie de elementos de análisis de las preguntas y de anotación de los resultados.

Instructor's Resource CD-ROM
0-7167-3952-6
Ofrece todas las imágenes del libro y las animaciones en dos formatos —como parte del *software Presentation Manager Pro* y en archivos JPEG. Con el *Presentation Manager*, los profesores pueden preparar rápidamente las figuras que emplearán durante las clases. Los archivos JPEG pueden ser utilizados por los profesores que utilicen programas para presentaciones disponibles comercialmente.

Transparency Set
0-7167-3526-1
Una colección de transparencias a todo color que reproducen 150 figuras fundamentales del libro.

Programas para cursos de genética

El texto completo, que refleja el amplio espectro de conocimientos de la Genética moderna, proporciona una estructura de curso y un programa adecuados para una asignatura anual. Se puede confeccionar también un programa para una asignatura cuatrimestral escogiendo ciertos capítulos. Una posible selección para una asignatura cuatrimestral sería la que incluyera los Capítulos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 15, 17, 18, 23 y 24. Se podría confeccionar un curso sobre Genética molecular basado en los Capítulos que van del 8 al 23.

Agradecimientos

Agradecemos a las siguientes personas de W. H. Freeman and Company su considerable apoyo durante la preparación de esta edición: Randi Rossignol, editor de desarrollo; Philip McCaffrey, editor gerente; Mary Louise Byrd, editora de proyectos; Cambraia Magalhaes, diseñadora; Bill Page, coordinador de ilustraciones; Lou Capaldo, ayudante del coordinador de ilustraciones; Kathy Bendo, editora de fotografía; Jennifer MacMillan, ayudante de la editora de fotografía; Susan Wein, gerente de producción; Nichole Folchetti, editora patrocinadora; John Britch, director comercial ejecutivo; Patrick Shriner, director de difusión y suplementos; Charles van Wagner, editor de difusión y suplementos; Ellen Cash, vicepresidente, directora de producción, y Shawn Churchman y Melanie Mays, ayudantes de dirección. Nuestro agradecimiento también a Patricia Zimmerman, correctora del manuscrito; Marsha Coen, artista de composición; Chris Hunt, encargada de los índices, y Elaine Rosenberg, correctora de pruebas.

Jeffrey H. Miller desea agradecer a Ann Miller su constante apoyo.

Finalmente, extendemos nuestro reconocimiento y gratitud a los colegas que revisaron el manuscrito, cuyas ideas y consejos han sido de gran utilidad:

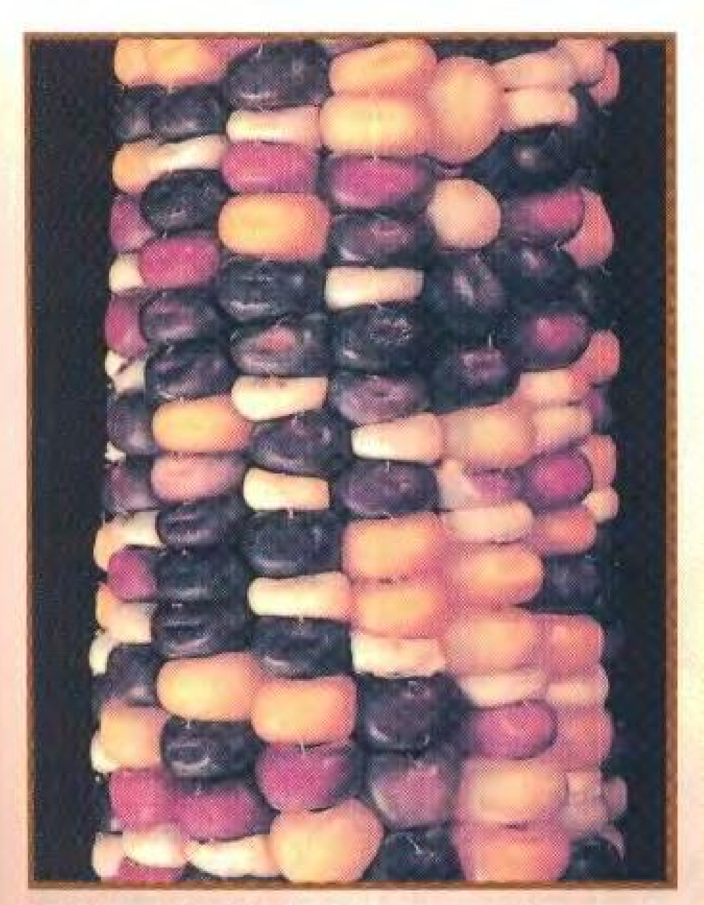
Colleen Belk	*University of Minnesota, Duluth*
Ralph Bertrand	*Colorado College*
John Bowman	*University of California, Davis*
Glen Collier	*University of Tulsa*
David S. Durica	*University of Oklahoma*
Deborah Eastman	*Southwstern University*
Ronald Ellis	*University of Michigan*
John Ellison	*Texas A&M—College Station*
Robert Fowler	*San Jose State University*
Dan Garza	*Florida State University*
Elliott S. Godstein	*Arizona State University*

Muriel Herrington	*Concordia University*
Robert Holmgren	*Northwestern University*
Andrew Hoyt	*The Johns Hopkins University*
Lynne A. Hunter	*University of Pittsburgh*
David Hyde	*University of Notre Dame*
Bob Ivarie	*University of Georgia*
Fordyce G. Lux III	*Lander University*
William McGinnis	*University of California, San Diego*
Bruce McKee	*University of Texas, Knoxville*
Gregg Orloff	*Emory University*
Michael H. Perlin	*University of Louisville*
Dennis T. Ray	*The University of Arizona*
Sue Jinks-Robertson	*Emory University*
Laura Runyen-Janecky	*Southwestern University*
Mark Sanders	*University of California, Davis*
David E. Sheppard	*University of Delaware*
Laurence Von Kalm	*University of Central Florida*
Bruce Walsh	*University of Arizona*
Edmund J. Zimmerer	*Murray State University*

Confiamos en que esta edición sirva de auténtica conmemoración de la Genética. Como autores, esperamos haber puesto de manifiesto nuestra pasión por el tema y que el libro anime al lector a realizar personalmente experimentos genéticos, ya sea como científico profesional, como estudiante, como aficionado a la mejora o como naturalista. Si no es este el caso, sí esperamos dejar al menos en el lector una impresión duradera de la penetración, la elegancia y el poder del análisis genético.

1

GENÉTICA Y SER VIVO



Variación genética del color de los granos de trigo. Cada grano representa un individuo distinto con una constitución genética propia. La fotografía es un símbolo de la historia del interés de la humanidad por la herencia. Miles de años antes del establecimiento de la Genética como disciplina moderna, el hombre ya mejoraba el maíz. Como prolongación de esa tradición, el maíz es hoy día uno de los principales organismos de investigación en Genética clásica y molecular.
(William Sheridan, University of North Dakota; fotografía de Travis Amos.)

Ideas fundamentales

El material hereditario es el DNA.

El DNA es una hélice doble formada por dos cadenas de nucleótidos entrelazadas y orientadas en direcciones opuestas.

En la replicación del DNA, las cadenas se separan y actúan como moldes para dar lugar a dos moléculas de DNA idénticas a la original.

Las unidades funcionales del DNA son los genes.

Un gen es un tramo de DNA que es copiado para hacer RNA. La secuencia de nucleótidos del RNA es traducida a la de aminoácidos de una proteína.

Las proteínas son las responsables principales de la estructura básica y las propiedades fisiológicas de un organismo.

Las características de una especie están cifradas en sus genes.

La variación dentro de una especie se debe a la variación hereditaria, a la ambiental o a ambas.

La variación hereditaria se debe a la existencia de formas alternativas de los genes (alelos).

¿Por qué estudiar Genética? Hay dos razones básicas. En primer lugar, la Genética ocupa hoy una posición central en toda la Biología. Su conocimiento resulta, por tanto, esencial para cualquier estudioso serio de la vida animal, vegetal o microbiana. En segundo lugar, la Genética ejerce un protagonismo central, como no lo hace ninguna otra disciplina científica, en numerosos aspectos de la vida humana. Afecta a nuestra humanidad de formas muy diversas. Ciertamente, los temas genéticos afloran en nuestras vidas casi a diario, y ninguna persona con inquietudes intelectuales puede permitirse ignorar sus descubrimientos. En este capítulo haremos una revisión general de la ciencia de la Genética, mostrando cómo ha llegado a ocupar una posición tan crucial. Ofreceremos, además, un panorama general en el que poder encajar los siguientes capítulos.

Primero debemos definir la Genética. Algunos la definen como el estudio de la herencia, pero los fenómenos hereditarios llamaron la atención de los seres humanos mucho antes de que existieran la Biología o la Genética como las disciplinas científicas que hoy conocemos. Nuestros antepasados primitivos mejoraban plantas cultivables y animales domésticos, escogiendo para cruzarlos aquellos individuos de características más deseables. También debieron sentir curiosidad por la herencia de la individualidad de los seres humanos y hacerse preguntas tales como «¿por qué se parecen los hijos a sus padres?» o «¿por qué ciertas enfermedades se dan en familias?». Sin embargo, tales individuos no pueden ser calificados de genetistas. Entendida como un conjunto de postulados y de métodos analíticos, la Genética no comenzó hasta la década de 1860, cuando un monje agustino llamado Gregor Mendel (Fig. 1-1) realizó una serie de experimentos que apuntaban hacia la existencia de unos elementos biológicos que ahora llamamos genes. La palabra *Genética* deriva de la palabra «gen», y son los genes los que constituyen el epicentro del tema. Los genes están siempre en el centro de los estudios de los genetistas, realicen éstos sus trabajos al nivel molecular, celular, de organismo, familiar, poblacional o evolutivo. En pocas palabras, la Genética es el estudio de los genes.

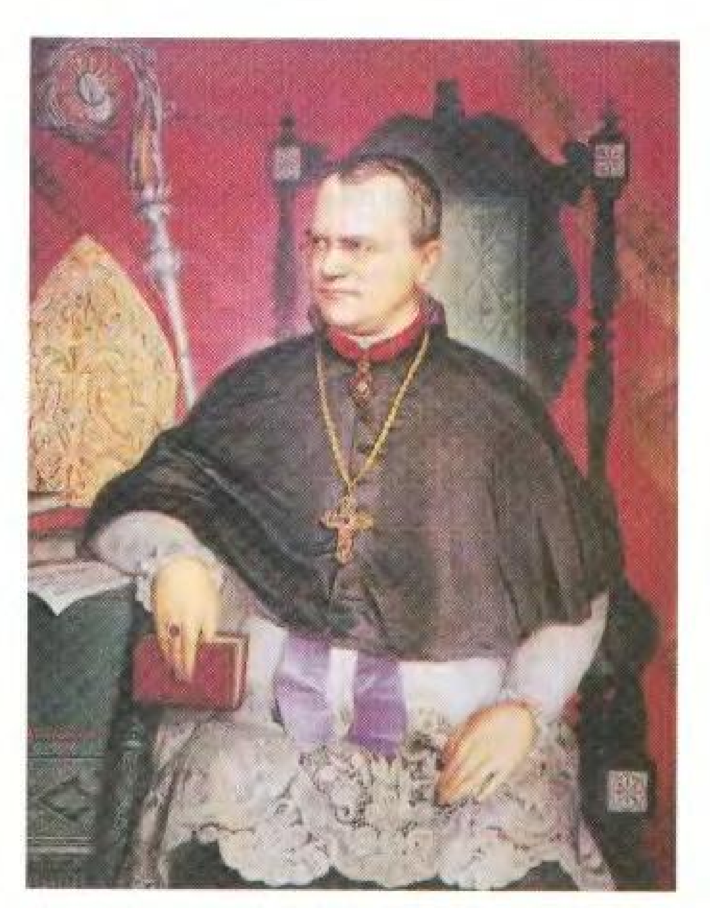


Figura 1-1. Gregor Mendel. (Museo de Moravia, Brno.)

¿Qué es un gen? Un gen es un trozo de una molécula en forma de cinta y constituida por una hélice doble, a la que llamamos **ácido desoxirribonucleico**, abreviado **DNA**. El descubrimiento de los genes y el conocimiento de su estructura molecular y su función ha dado origen a profundas ideas sobre dos de los mayores misterios de la Biología:

1. ¿Qué hace que una especie sea como es? Sabemos que los gatos siempre tienen gatitos y las personas siempre tienen bebés. Esta observación común conduce de forma natural a preguntas sobre la determinación de las propiedades de una especie. Tal determinación debe ser hereditaria ya que, por ejemplo, la capacidad para engendrar gatitos es recibida por cada generación de gatos.

2. ¿Qué provoca la variación dentro de una especie? Somos capaces de distinguir a unas personas de otras, así como a nuestro gato de otros gatos. Tales diferencias dentro de una especie requieren explicación. Algunos de los rasgos diferenciados son claramente familiares; por ejemplo, animales de un color concreto tienen con frecuencia descendientes del mismo color y, sin duda, ciertas características de los seres humanos, como la forma de la nariz, «van por familias». Así pues, debemos sospechar que un componente hereditario explica al menos una parte de la variación dentro de una especie.

La contestación a la primera pregunta es que los genes dictan las propiedades inherentes a una especie. Los productos de la mayoría de los genes son **proteínas** concretas. Las proteínas son las principales macromoléculas de un organismo. Cuando observas a un ser vivo, cuanto ves es proteína o algo producido por una proteína. La secuencia de aminoácidos de una proteína está cifrada en un gen. El momento y la tasa de producción de las proteínas y otros componentes celulares depende tanto de la acción de genes presentes dentro de las células como del ambiente en el que el organismo se desarrolla y funciona.

La contestación a la segunda pregunta es que cualquier gen puede existir en varias formas, que difieren unas de otras, generalmente, muy poco. Estas formas de un gen se denominan **alelos**. La variación alélica es la responsable de la variación hereditaria dentro de una especie. Al nivel de las proteínas, la variación alélica se convierte en variación proteica.

Las dos secciones siguientes muestran cómo los genes influyen sobre las propiedades inherentes de una especie, y cómo la variación alélica contribuye a la variación intraespecífica. Se trata de una visión panorámica. La mayoría de los detalles se presentarán en capítulos posteriores.

Los genes como determinantes de las propiedades inherentes a una especie

¿Cuál es la naturaleza de los genes, y cómo llevan a cabo su papel biológico? Hay tres propiedades fundamentales que cabe exigir a los genes y al DNA del que están compuestos.

1. *Replicación.* Las moléculas hereditarias deben ser susceptibles de replicarse en dos fases críticas del ciclo de vida (Fig. 1-2). La primera es la generación del tipo celular que asegurará la continuación de una especie de una generación a la siguiente. En plantas y animales, estas células son los gametos: óvulo y espermatozoide. La otra fase se produce cuando la primera célula de un nuevo organismo sufre múltiples rondas de división para generar un organismo multicelular. En plantas y animales, ésta es la fase en la que el óvulo fecundado, el **cigoto**, se divide repetidamente para producir la compleja apariencia orgánica que reconocemos.
2. *Generación de forma.* Podemos pensar en las estructuras funcionales que constituyen un organismo como forma o sustancia. Visto así, el DNA posee «información» esencial; en otras palabras, posee «aquello que es necesario para dar forma».
3. *Mutación.* Un gen que ha pasado de una forma alélica a otra ha sufrido mutación: un hecho raro, pero que ocurre de forma regular. La mutación no es sólo la causa de variación dentro de una especie, sino, a largo plazo, la materia prima de la evolución.

Hablaremos de replicación y generación de forma en esta sección, y de mutación en la siguiente.

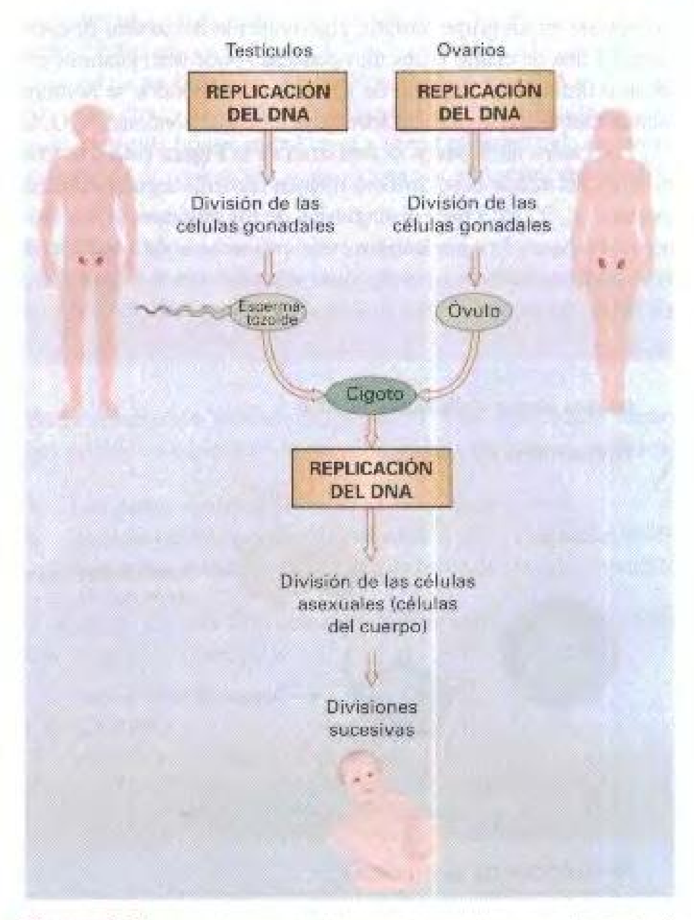


Figura 1-2. La replicación del DNA es la base de la perpetuación de la vida a lo largo del tiempo.

El DNA y su replicación

La dotación básica de DNA de un organismo se denomina **genoma**. Las células corporales de la mayoría de las plantas y animales contienen dos genomas (Fig. 1-3). Se trata de organismos **diploides**. Las células de la mayoría de los hongos, algas y bacterias poseen un solo genoma. Son organismos **haploides**. El propio genoma está formado de una o más moléculas extraordinariamente largas de DNA que se organizan en **cromosomas**. Por ejemplo, las células del cuerpo humano poseen dos dotaciones de 23 cromosomas, es decir un total de 46. Los genes son, sencillamente, las regiones funcionales del DNA cromosómico. Cada cromosoma del genoma contiene un conjunto distinto de genes. En las células diploides, cada cromosoma y sus genes componentes están presentes dos veces. De dos cromosomas que poseen el mismo conjunto de genes se dice que son **homólogos**. Cuando una célula se divide, todos los cromosomas (uno o dos genomas) se replican, y así cada célula hija recibe una dotación cromosómica completa. Por tanto, la unidad de replicación es el cromosoma; cuando un cromosoma se replica, todos los genes de ese cromosoma se replican automáticamente con él.

Para comprender la replicación, es necesario conocer primero la estructura básica del DNA. El DNA es una estructura lineal, una hélice doble con aspecto de escalera de caracol molecular. La hélice doble está formada por dos cadenas entrelazadas de unas unidades básicas denominadas **nucleótidos**. Cada nucleóti-

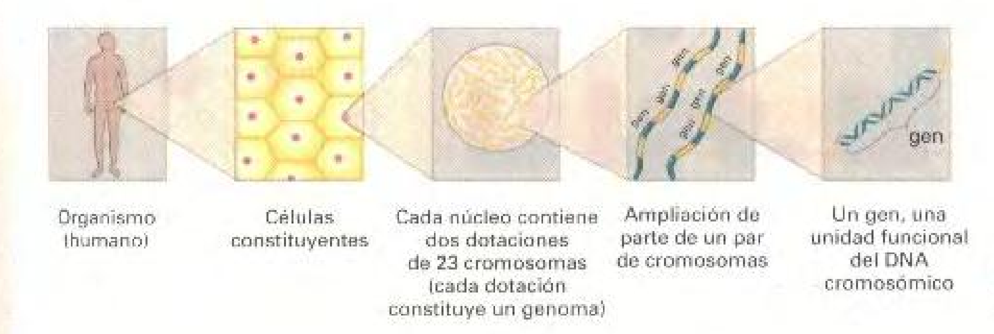


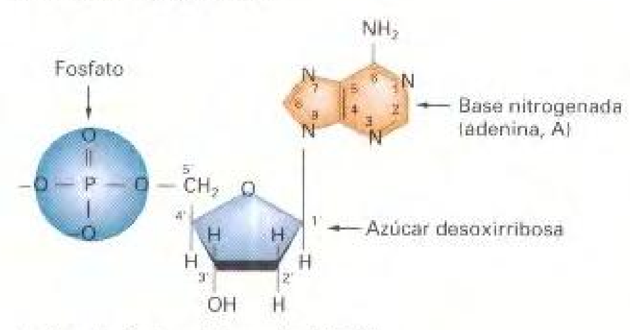
Figura 1-3. Visiones sucesivamente aumentadas de un organismo hasta llegar al material genético.

do consiste en un grupo fosfato, una molécula del azúcar desoxirribosa y una de cuatro bases nitrogenadas —adenina, guanina, citosina o timina—. Cada uno de los cuatro nucleótidos se nombra habitualmente con la primera letra de la base que contiene: A, G, C o T. Los cuatro nucleótidos se muestran en la Figura 1-4*a* y *b*. Los carbonos del azúcar desoxirribosa reciben números seguidos de una «prima» (1', 2', etc.) para distinguirlos de los números de los átomos de las bases. Los nucleótidos están enlazados unos a otros en el DNA por sus posiciones 3' y 5', como se muestra en la Figura 1-4*c*; por tanto, decimos de cada cadena que tiene **polaridad**, con un extremo que contiene un grupo fosfato 5' y otro extremo que contiene un grupo OH 3'. Los enlaces que conectan los grupos sucesivos de azúcar y fosfato se denominan enlaces **fosfodiésteres**.

Las polaridades de las dos cadenas de nucleótidos entrelazadas son opuestas; se dice que ambas cadenas son **antiparalelas**. Las dos cadenas de nucleótidos se mantienen unidas mediante enlaces débiles, denominados **puentes de hidrógeno**, entre las bases. El establecimiento de tales enlaces es muy específico, debido al encaje a modo de «llave y cerradura» entre la forma y las cargas atómicas de las bases. La adenina se empareja sólo con la

(a) Los cuatro nucleótidos del DNA

Nucleótidos de purinas

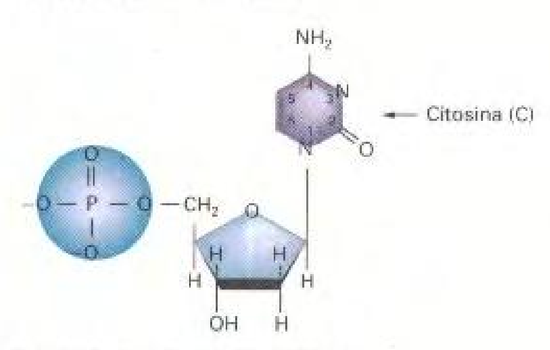


Fosfato de 5'-desoxiadenosina (dAMP)

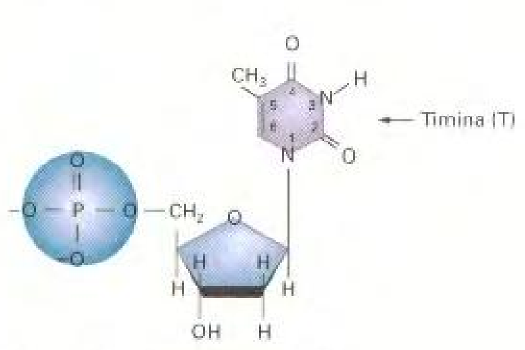
Guanina (G)

Fosfato de 5'-desoxiguanosina (dGMP)

Nucleótidos de pirimidinas



Fosfato de 5'-desoxicitidina (dCMP)



Fosfato de 5'-desoxitimidina (dTMP)

(b) Representación simplificada de los cuatro nucleótidos



(c) Nucleótidos polimerizados

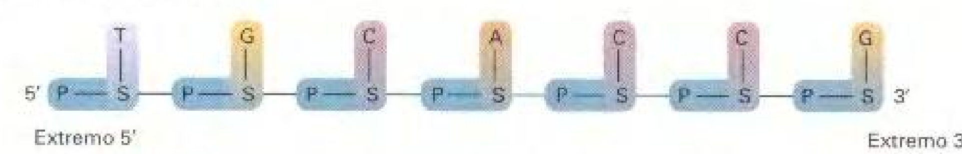


Figura 1-4. Las unidades constituyentes del DNA. (a) Estructura química de los cuatro nucleótidos (dos con bases púricas y dos con bases pirimidínicas). El azúcar se denomina desoxirribosa porque es una variante de un azúcar común, la ribosa, que contiene un átomo más de oxígeno. (b) Representación esquemática de los nucleótidos del DNA. (c) El DNA es un polímero de nucleótidos. Abreviaturas: P, fosfato; S, azúcar desoxirribosa; A, T, G y C, las bases adenina, timina, guanina y citosina, respectivamente.

timina, y la guanina sólo con la citosina. Se dice de las bases que forman estas parejas que son **complementarias**. Así, un segmento corto de DNA de secuencia arbitraria sería:

5'-CAGT-3'
3'-GTCA-5'

Esta misma estructura aparece con mayor detalle en la Figura 1-5. Aunque los puentes de hidrógeno son individualmente débiles, su acción combinada mantiene las dos cadenas unidas de forma estable. Por otro lado, es importante que los enlaces entre las bases sean relativamente débiles, ya que, como veremos, las dos cadenas deben separarse para que se produzca el proceso de replicación. Los pares de bases, que corren por el interior de la hélice doble, son estructuras **hidrófobas** planas que tienden a apilarse debido a la exclusión de las moléculas de agua. Este apilamiento obliga a las dos cadenas entrelazadas del DNA a adoptar su conformación helicoidal (Fig. 1-6).

Para que se produzca la replicación, las dos cadenas de la hélice doble deben desenrollarse en una dirección, al modo de la apertura de una cremallera. Las dos cadenas expuestas de nucleótidos actúan entonces como guías de alineación, o **moldes**, en la colocación de nucleótidos libres. Estos nucleótidos se han sintetizado en la célula y llegan al núcleo por difusión. Su polimerización en una nueva cadena es catalizada por la enzima **polimerasa de DNA**. Esta enzima se une inicialmente al DNA de doble cadena en una secuencia específica de nucleótidos llamada **origen de replicación**, desplazándose luego a lo largo del DNA para polimerizar las cadenas nuevas, como se muestra en la Figura 1-7. El punto crucial reflejado en la Figura 1-7 es que, debido a la complementariedad de las bases, las dos moléculas **hijas de DNA** son idénticas una a otra, y a la molécula original. Observe, sin embargo, que cada molécula hija es mitad vieja y mitad polimerizada de nuevo. Esta forma de replicación se denomina por ello **semiconservativa**.

COROLARIO

El DNA está formado por dos cadenas de nucleótidos antiparalelas que se mantienen unidas por los puentes de hidrógeno complementarios de A con T y de G con C.

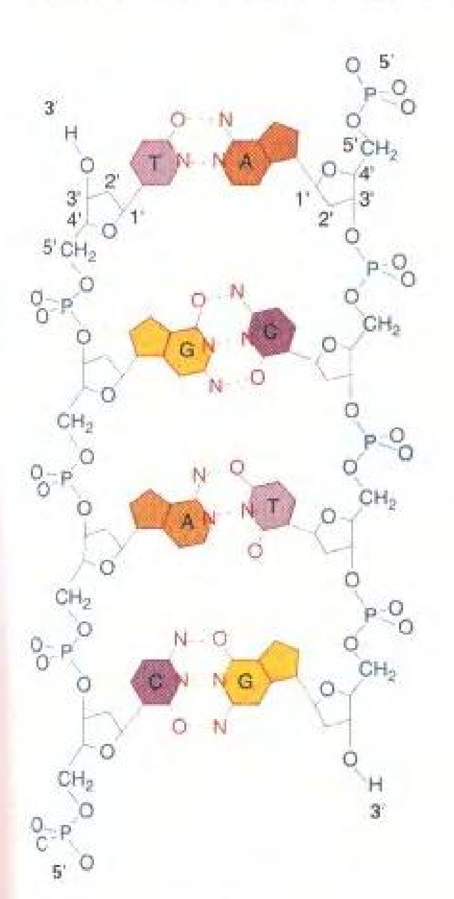
En la descripción precedente del DNA y su replicación, vemos dos principios básicos en la mayoría de las operaciones genéticas:

1. Las bases complementarias se unen unas a otras.
2. Algunas proteínas (como la polimerasa de DNA) actúan uniéndose a una secuencia específica de bases de un ácido nucleico.

A lo largo de este libro encontraremos numerosas veces estos dos principios operativos.

COROLARIO

La complementariedad de las bases y la unión de proteínas a secuencias de bases específicas de un ácido nucleico son dos mecanismos recurrentes en Genética.



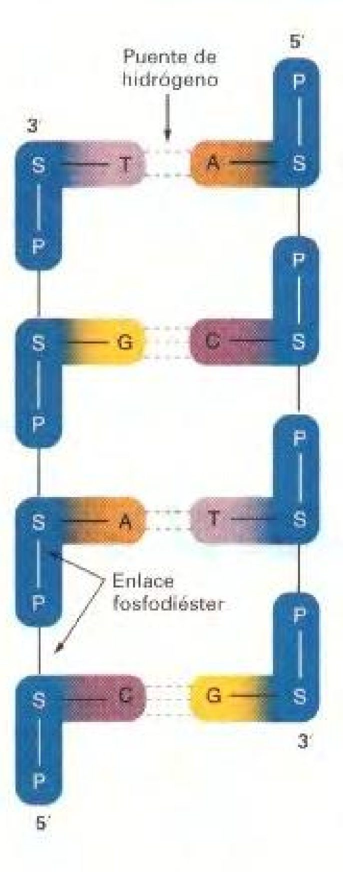


Figura 1-5. Disposición de los componentes del DNA, un tramo del cual se ha desenrollado para mostrar las estructuras con más claridad. (a) Esquema químico preciso que muestra el armazón de azúcar–fosfato en color azul y los puentes de hidrógeno entre las bases situadas en el centro de la molécula. (b) Versión simplificada del mismo segmento destacando la orientación antiparalela de los nucleótidos, que se representan en forma de «calcetín» con los extremos 5' como los «dedos» y los extremos 3' como los «talones».

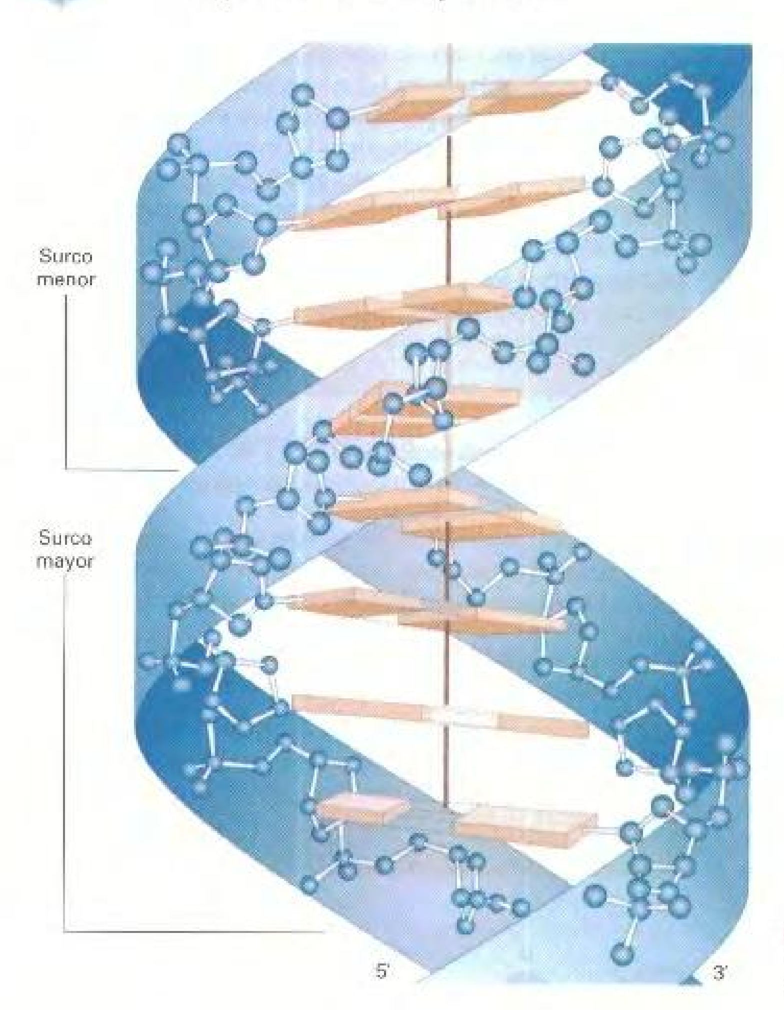


Figura 1-6. Representación en forma de cintas de las dos cadenas de la hélice doble de DNA. Azul = esqueleto azúcar–fosfato; marrón = pares de bases.

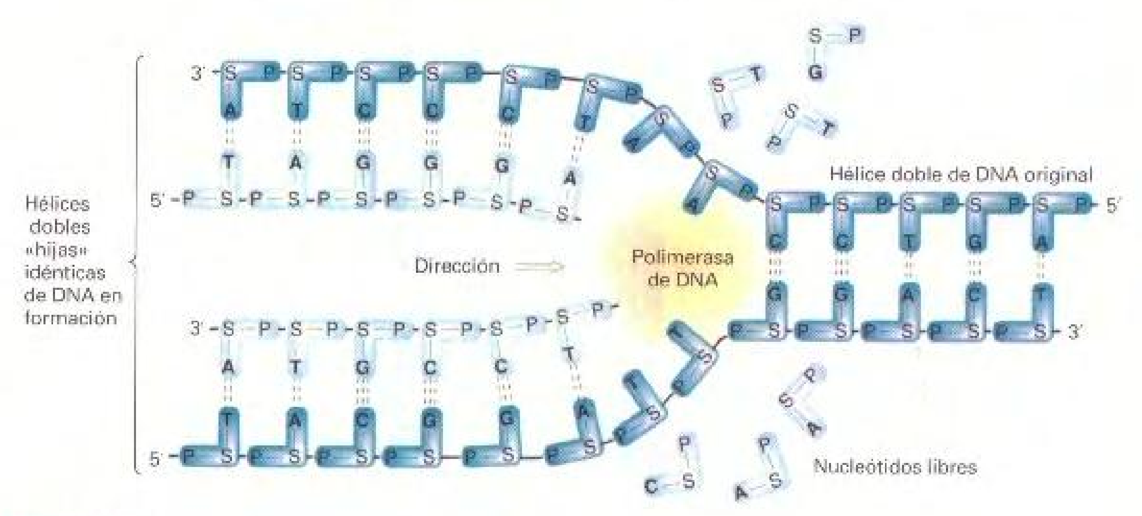


Figura 1-7. La replicación semiconservativa en acción.

Generación de forma

Si el DNA representa información, ¿qué constituye la forma en la célula? La respuesta simple es «proteína», ya que la mayoría de las estructuras de una célula son proteínas o han sido generadas por proteínas. En esta sección seguiremos los pasos mediante los que la información se hace forma.

Cada gen funcional es leído por la maquinaria celular para generar el producto de ese gen. El producto de la mayoría de los genes es una proteína específica. El primer paso que da la célula para generar una proteína es copiar, o **transcribir**, la información escrita en el DNA del gen en una forma molecular relacionada, pero de una sola cadena, llamada **ácido ribonucleico**

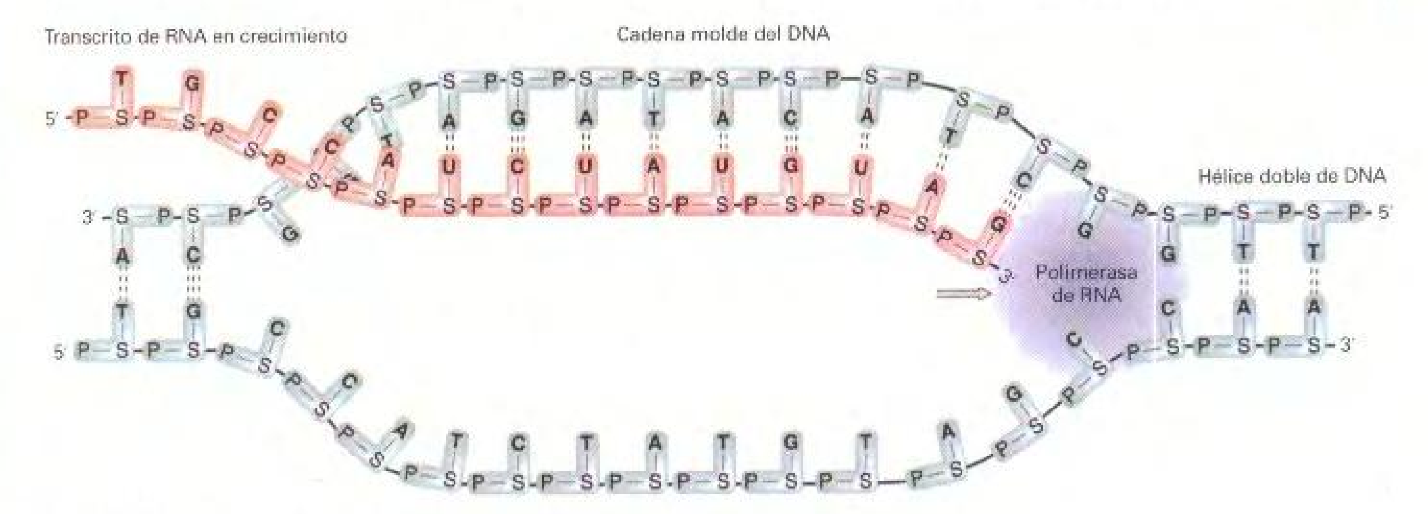


Figura 1-8. El proceso de la transcripción.

(**RNA**). Esta molécula de RNA constituye una «copia de trabajo» del gen. En realidad, un gen puede definirse como un tramo de DNA que determina un RNA funcional. Como el DNA, el RNA está formado por nucleótidos, pero éstos contienen el azúcar ribosa en lugar de la desoxirribosa. Además, en lugar de timina, el RNA contiene uracilo (U), una base que establece puentes de hidrógeno idénticos a los de la timina. Así pues, las bases del RNA son A, G, C y U. La copia del gen hecha de RNA se denomina **transcrito**.

La polimerización de ribonucleótidos para formar el RNA es catalizada por la enzima **polimerasa de RNA**. Esta enzima se une a una secuencia específica, el sitio de inicio de la transcripción, situada en un extremo del gen. La enzima separa primero las dos cadenas del DNA. Luego se desplaza a lo largo del gen, manteniendo la «burbuja» de cadenas separadas y, conforme avanza, usa sólo *una* de dichas cadenas como molde, sintetizando una cadena cada vez más larga de nucleótidos enlazados que, al final, se convertirá en el transcrito completo del gen. La adición de ribonucleótidos por parte de la polimerasa de RNA se produce siempre por el extremo 3' de la cadena en crecimiento. La transcripción se representa esquemáticamente en la Figura 1-8. Observe de nuevo los dos poderosos principios operativos de las interacciones entre macromoléculas: la polimerasa de RNA se une a una secuencia de iniciación específica en el DNA y se desplaza luego a lo largo de éste, ilustrando así la unión proteína-acido nucleico; la acción del molde de DNA, alineando los ribonucleótidos, se basa en el principio de complementariedad de las bases, esta vez entre bases del DNA y bases del RNA. Observe que el transcrito de RNA tiene la misma secuencia que la cadena de DNA que no actúa de molde (Fig. 1-8).

COROLARIO

Durante la transcripción, una de las cadenas del DNA actúa como molde; los ribonucleótidos se añaden por el extremo 3' en crecimiento, en una reacción catalizada por la enzima polimerasa de RNA.

La función biológica de la mayoría de los genes es contener o llevar cifrada información sobre la composición de las proteínas. Esta composición, junto con el momento y la cantidad producida de cada proteína, es responsable, de una forma muy determinante, de la estructura y fisiología de los organismos. La estructura primaria de una proteína es una cadena lineal de unidades componentes llamadas **aminoácidos**. Esta cadena primaria se enrolla, se pliega y, a veces, se une a otras cadenas para formar la proteína funcional. Las proteínas son importantes como elementos estructurales —como ocurre con las proteínas que forman los cabellos, la piel o el músculo —o como agentes activos de procesos celulares —como ocurre con las enzimas y proteínas del transporte activo—. Cada gen es responsable de una proteína concreta o parte de una proteína. Veamos cómo está organizado un gen. Para el propósito de esta revisión nos referiremos a los genes que determinan las proteínas de los **eucariotas**. Los eucariotas son los organismos cuyas células poseen un núcleo rodeado de una membrana. Fuera del núcleo de cada célula existe una red compleja de membranas, que incluye el retículo endoplásmico y

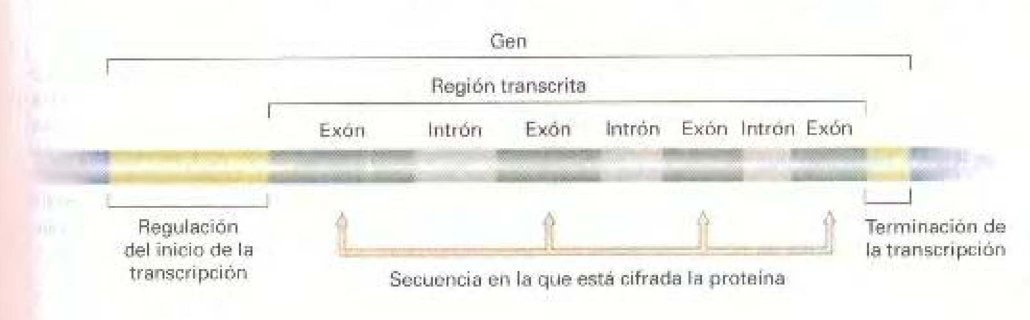


Figura 1-9. Organización general de un gen eucariótico. Este ejemplo tiene tres intrones y cuatro exones.

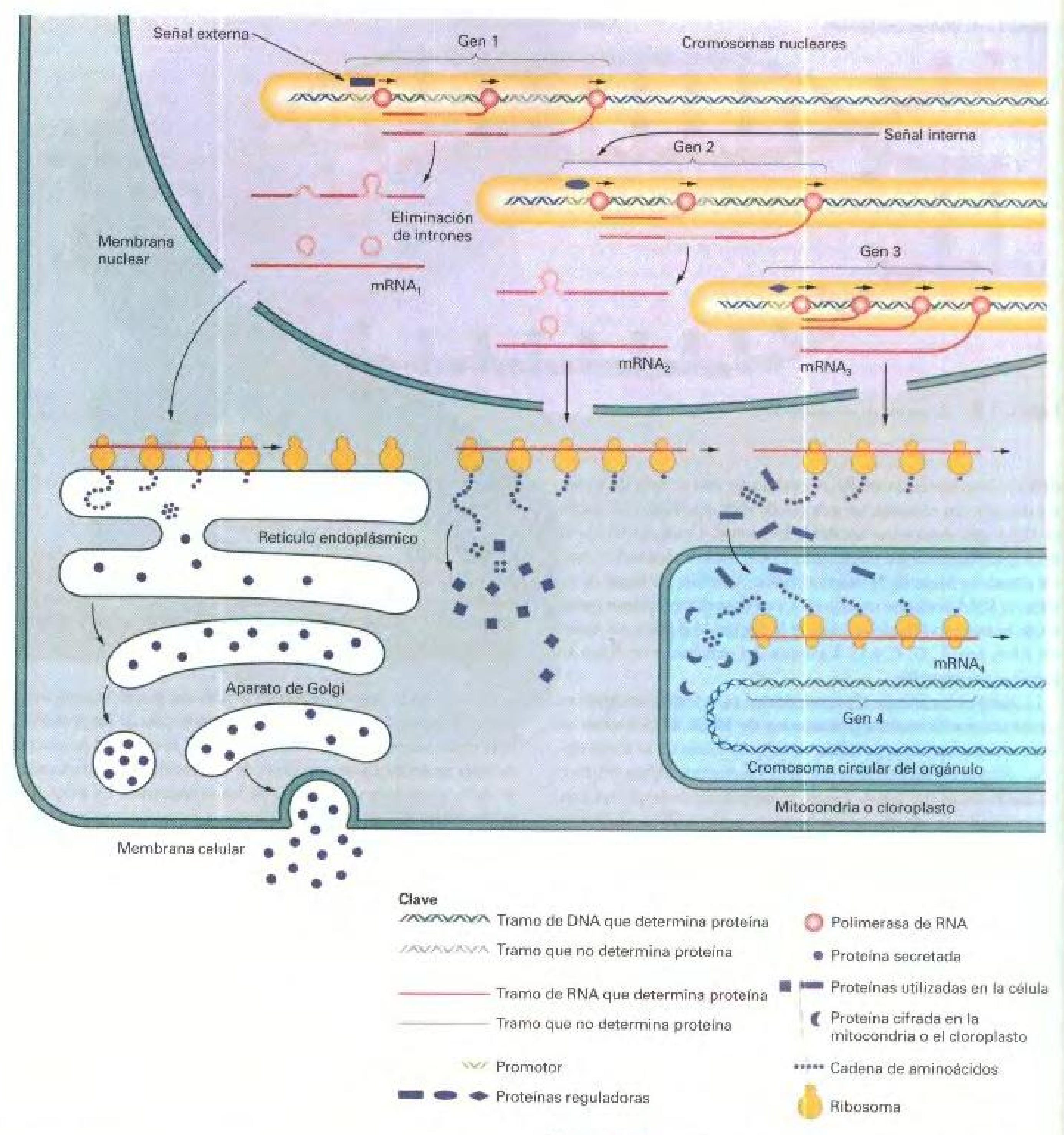


Figura 1-10. Esquema simplificado de la acción génica en una célula eucariótica. El flujo básico de la información genética va de DNA a RNA y a proteína. Se muestran cuatro tipos de genes. El gen 1 responde a señales reguladoras externas y da lugar a una proteína que será secretada; el gen 2 responde a señales internas y da lugar a una proteína que actuará en el citoplasma; el gen 3 da lugar a una proteína que será transportada a un orgánulo; el gen 4 forma parte del DNA del orgánulo y da lugar a una proteína que actuará en el propio orgánulo. La mayoría de los genes eucarióticos contienen intrones, regiones (generalmente no codificadoras) que son eliminadas para fabricar el RNA mensajero funcional. Observe que muchos genes de los orgánulos contienen intrones y que se necesita una enzima fabricadora de RNA para la síntesis del mRNA organular. Estos detalles han sido omitidos del dibujo del orgánulo para mayor claridad. (Los intrones se explicarán con detalle en próximos capítulos).

el aparato de Golgi, y orgánulos como mitocondrias y cloroplastos. Animales, plantas, algas y hongos son eucariotas.

La Figura 1-9 muestra la estructura general de un gen eucariótico. En un extremo, hay una región reguladora a la que se unen varias proteínas (como la polimerasa de RNA), haciendo que el gen se transcriba en el momento adecuado y el número correcto de veces. Una región del otro extremo contiene secuencias que provocan la terminación de la transcripción. La secuencia en la que está cifrada la proteína de muchos genes eucarióticos está

interrumpida por tramos (en número de uno a muchos) llamados **intrones**. El origen y funciones de los intrones no ha sido aclarado todavía. Los intrones son escindidos del transcrito primario. Los tramos de la secuencia que determinan la proteína, situados entre los intrones, se denominan **exones**.

La Figura 1-10 ilustra los aspectos esenciales de la acción de los genes en una célula eucariótica prototípica. El núcleo contiene la mayor parte del DNA, pero observe que mitocondrias y cloroplastos poseen también pequeños cromosomas.

Algunos genes que determinan proteínas se transcriben más o menos constantemente; son los genes que cumplen funciones «caseras», necesarios siempre para ocupaciones básicas. Otros genes se expresan o no, de acuerdo con las funciones del organismo en momentos determinados o en circunstancias ambientales concretas. Las señales que enmascaran o desenmascaran a un gen pueden venir del exterior de la célula; por ejemplo, de una hormona esteroide o un nutriente. O vienen del propio interior de la célula, resultado de la expresión de otros genes. En cualquier caso, secuencias especiales (*reguladoras*) en el DNA se ven afectadas directamente por la señal, afectando ellas a su vez la transcripción del gen responsable de una proteína. Las moléculas reguladoras que actúan de señal se unen al DNA regulador de los genes dianas para controlar la síntesis de los transcritos.

Cuando se eliminan los intrones de un transcrito primario, la secuencia de RNA que queda se denomina **RNA mensajero (mRNA)**. Las moléculas de mRNA salen del núcleo a través de poros nucleares y entran en el citoplasma, donde tiene lugar la síntesis de proteínas. La secuencia de nucleótidos de una molécula de mRNA se «lee» desde el extremo 5′ hacia el extremo 3′, en grupos de tres. Tales grupos de tres se denominan **codones**.

5′... AUU	CCG	UAC	GUA	AAU	UUG ... 3′
Codón	Codón	Codón	Codón	Codón	Codón

Como hay cuatro nucleótidos, tenemos $4 \times 4 \times 4 = 64$ codones diferentes, cada uno de los cuales significa un aminoácido o señal para terminar la traducción. Por ejemplo, AUU significa isoleucina, CCG prolina, y UAG es un codón de terminación (*stop*).

La síntesis de las proteínas tiene lugar en unos orgánulos citoplasmáticos llamados ribosomas. Un ribosoma se une al extremo 5′ de una molécula de mRNA y se desplaza a lo largo de ella, catalizando el ensamblaje de la ristra de aminoácidos que constituirá la estructura primaria de la proteína. Esta cadena primaria se denomina **polipéptido**. Cada aminoácido es acarreado al ribosoma por una molécula de **RNA transferente (tRNA)** específica que se acopla en un codón del mRNA. El acople se produce mediante emparejamiento de bases entre un tramo de tres nucleótidos del tRNA, llamado **anticodón**, y el codón:

Anticodón en el tRNA	3′-GGA-5′
Codón en el mRNA	5′-CCU-3′

Como este proceso de leer la secuencia del mRNA y convertirla en una secuencia de aminoácidos es parecido al de convertir un idioma en otro, el proceso de síntesis de proteínas recibe el nombre de **traducción**. El proceso de traducción se muestra en la Figura 1-11.

Un convoy de ribosomas se mueve a lo largo de una molécula de mRNA, fabricando cada elemento del convoy el mismo polipéptido. Al final del mRNA, un codón de terminación provoca que el ribosoma se despegue para reanudar su acción sobre otro mRNA.

Hagamos una pausa para reconsiderar este asombroso proceso en relación con los principios de asociación entre macromoléculas. La alineación del anticodón del tRNA con el codón del mRNA se produce por complementariedad de bases. La unión del ribosoma al mRNA, su desplazamiento a lo largo de él y la unión del tRNA al ribosoma son todos ejemplos de unión proteína-ácido nucleico.

COROLARIO

La información de los genes responsables de proteínas es utilizada por la célula en dos pasos de transferencia informativa:

DNA
Transcripción ↓
RNA
Traducción ↓
proteína

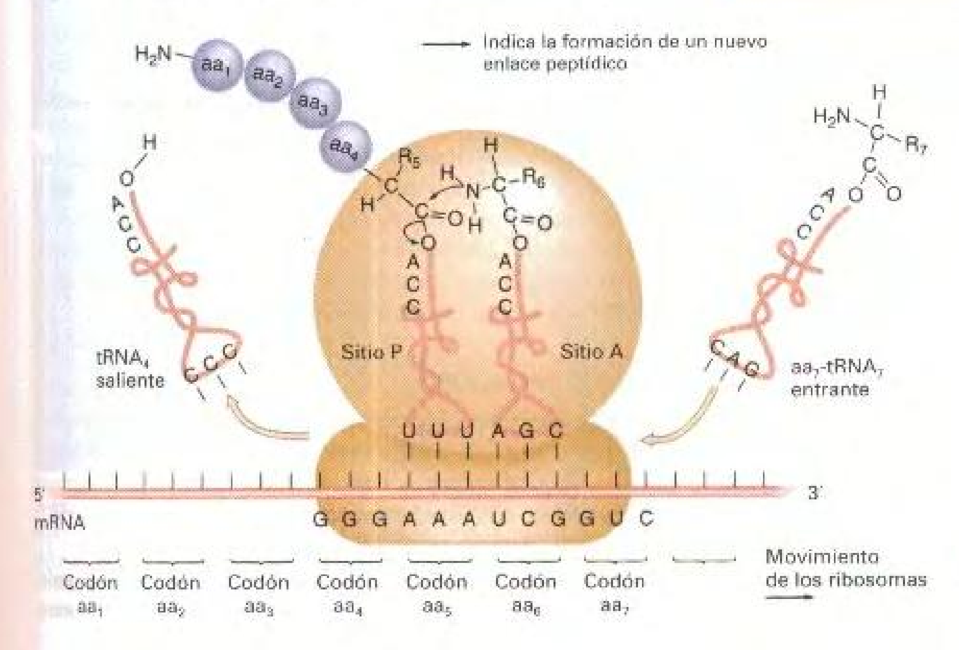
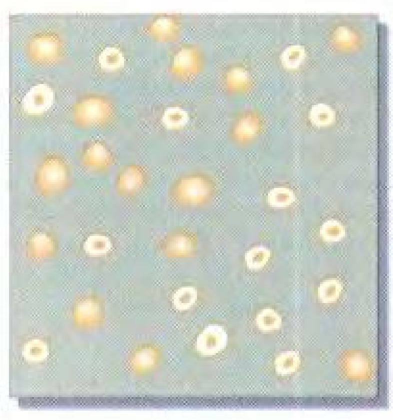
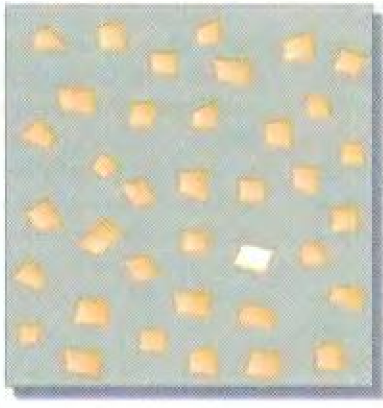


Figura 1-11. Adición de un aminoácido a la cadena polipeptídica en crecimiento durante la traducción del mRNA.







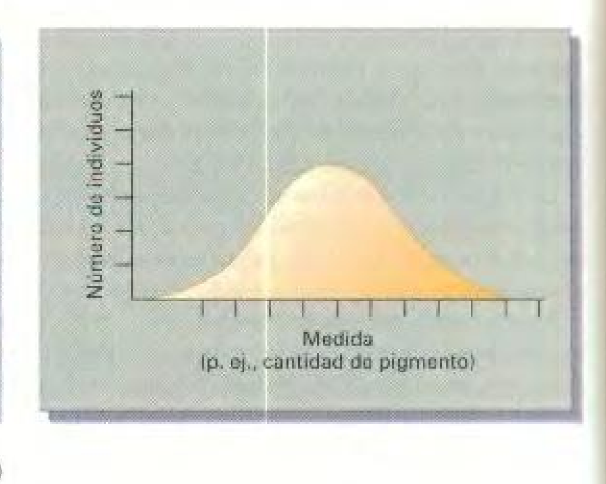


Figura 1-12. Variaciones discontinua y continua en poblaciones naturales. En las poblaciones que muestran variación discontinua para un carácter determinado, cada individuo manifiesta una de varias formas alternativas fácilmente distinguibles. En el primer panel, por ejemplo, una población de plantas manifiesta dos tipos frecuentes de frutos bien distintos, alados y sin alas (véase la Figura 1-14*a*). Tal variación se considera un *polimorfismo*. A veces, la gran mayoría de la población es de un solo tipo, y sólo una mutación ocasional provoca la aparición del tipo alternativo, como en el caso del tipo «alas vestigiales» de la mosca del vinagre, *Drosophila*. Las variantes discontinuas se deben, a menudo, a alelos de un solo gen. Por otro lado, la variación continua no muestra tales alternativas discretas; un carácter puede aparecer en la población en una gradación fenotípica continua. Puede que ello no se deba a causas genéticas —toda la variación sería debida al ambiente— o puede que haya genes implicados, normalmente varios o muchos.

Cada gen determina una proteína distinta, cada una con una función específica, bien dentro de la célula (por ejemplo, las proteínas representadas por rectángulos morados en la Figura 1-10), o bien tras su transporte a otras partes del organismo (las proteínas representadas por círculos morados). La síntesis de las proteínas exportadas (proteínas secretadas) tiene lugar en ribosomas situados sobre la superficie del retículo endoplásmico rugoso, un conjunto de vesículas largas y aplanadas. Ya terminadas, las cadenas de aminoácidos pasan al lumen del retículo endoplásmico, donde se pliegan espontáneamente en su forma de proteína. Las proteínas pueden sufrir entonces ciertas modificaciones, pero acabarán por pasar a las cámaras del aparato de Golgi, y de ahí a vesículas secretoras que terminarán fusionándose con la membrana celular y liberando su contenido al exterior.

Las proteínas destinadas a actuar en el citoplasma y la mayoría de las proteínas que actúan dentro de mitocondrias y cloroplastos se sintetizan en ribosomas del citoplasma que no están unidos a membranas. Así ocurre, por ejemplo, con las proteínas que actúan como enzimas de la glucólisis. Las proteínas destinadas a los orgánulos van marcadas de una forma especial, para dirigirlas hasta el interior de orgánulos concretos. Además, mitocondrias y cloroplastos contienen sus propias moléculas de DNA, pequeñas y circulares. La síntesis de las proteínas cifradas en los genes del DNA mitocondrial o cloroplástico tiene lugar en ribosomas alojados en los propios orgánulos. Las proteínas de mitocondrias y cloroplastos vienen, por tanto, de dos fuentes distintas: bien están regidas por el núcleo y se importan luego al orgánulo, o bien están regidas por el orgánulo y se fabrican dentro del compartimiento organular.

Los **procariotas** son organismos unicelulares, como las bacterias, cuya organización celular es más simple que la de los eucariotas; no hay un núcleo separado del citoplasma por una membrana nuclear. En términos generales, la síntesis proteica en los procariotas es similar a la de los eucariotas, con la participación de mRNA, tRNA y ribosomas, pero existen algunas diferencias notables. Por ejemplo, los procariotas carecen de intrones. Además, no hay compartimientos rodeados de membranas a través de las cuales deban pasar el RNA o las proteínas.

COROLARIO

El flujo de información de DNA a RNA y proteína es uno de los fundamentos del conocimiento biológico moderno.

Variación genética

Si todos los miembros de una especie poseen la misma dotación de genes, ¿cómo es que hay variación genética? Como se indicó anteriormente, la respuesta es que los genes vienen en formas distintas llamadas alelos. Dado un gen concreto, en una población pueden existir desde uno a muchos alelos diferentes; no obstante, como la mayoría de los organismos posee sólo una o dos dotaciones cromosómicas, cada organismo individual puede llevar sólo uno o dos alelos de cada gen. Los alelos de un gen se encuentran siempre en una determinada posición cromosómica. La variación alélica es la base de la variación hereditaria.

Tipos de variación

Es importante entender los tipos de variación que se encuentran en las poblaciones, ya que gran parte de la Genética tiene que ver con el análisis de variantes. Una forma conveniente de clasificar la variación es dividirla en continua y discontinua (Fig. 1-12). La variación alélica contribuye a ambas.

La mayor parte de la investigación genética del siglo pasado se ha realizado sobre la variación discontinua, por ser la forma

de variación más simple y más fácil de analizar. En la **variación discontinua**, un carácter aparece en la población en dos o más formas distintas y fácilmente separables llamadas **fenotipos**. Tales fenotipos alternativos resultan estar determinados a menudo por distintos alelos de un gen. Un buen ejemplo es el albinismo en los seres humanos, que concierne a fenotipos del carácter coloración de la piel. Las células de la piel de la mayoría de las personas acumulan un compuesto marrón oscuro o negro denominado melanina, el pigmento que da a nuestra piel su color variable desde el moreno pálido de las personas de origen europeo hasta el marrón o negro de las de origen tropical y subtropical. Aunque siempre raros, se encuentran individuos albinos en todas las razas; su piel y sus cabellos carecen por completo de pigmento (Fig. 1-13). La diferencia entre el fenotipo pigmentado y el no pigmentado se debe a dos alelos de un gen que participa en la síntesis de melanina. Los alelos de un gen se designan convencionalmente con letras. El alelo que determina la capacidad de fabricar melanina se llama *A*, y el alelo responsable de la incapacidad de fabricar melanina (provocando el albinismo) se denomina *a*, para mostrar así que están relacionados. La constitución alélica de un organismo es su **genotipo**, el sustrato hereditario del fenotipo. Como los seres humanos poseen dos dotaciones cromosómicas en cada célula, los genotipos pueden ser *A/A*, *A/a* o *a/a* (la barra inclinada indica que forman pareja). El fenotipo de *A/A* es pigmentado, el de *a/a* es albino y el de *A/a* es pigmentado. La *capacidad* para producir el pigmento se expresa por encima de la *incapacidad* de hacerlo (se dice que *A* es dominante, como veremos en el Capítulo 2).

Aunque diferencias alélicas provocan diferencias fenotípicas, tales como pigmentado y albino, ello no significa que un solo gen controle el color de la piel. Sabemos que existen varios. Sin embargo, la *diferencia* entre pigmentado, en cualquier grado, y albino se debe a la *diferencia* en un gen; el estado de los demás genes de la pigmentación es irrelevante.

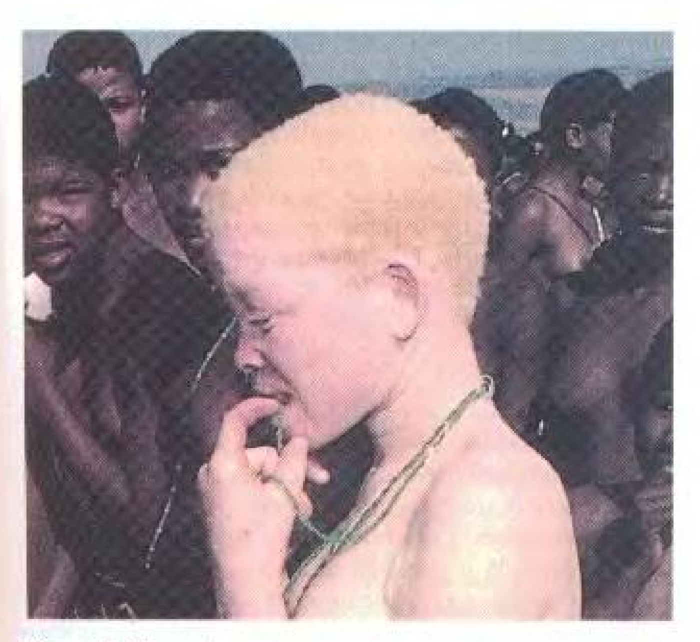


Figura 1-13. Albino. El fenotipo se debe a la presencia en dos dosis de un alelo recesivo: *a/a*. El alelo dominante *A* determina un paso normal de la síntesis del pigmento oscuro melanina de las células de la piel, pelo y retinas. Tal paso no se produce en los individuos *a/a*, bloqueándose la síntesis de melanina (© Yves Gellie/Icone).

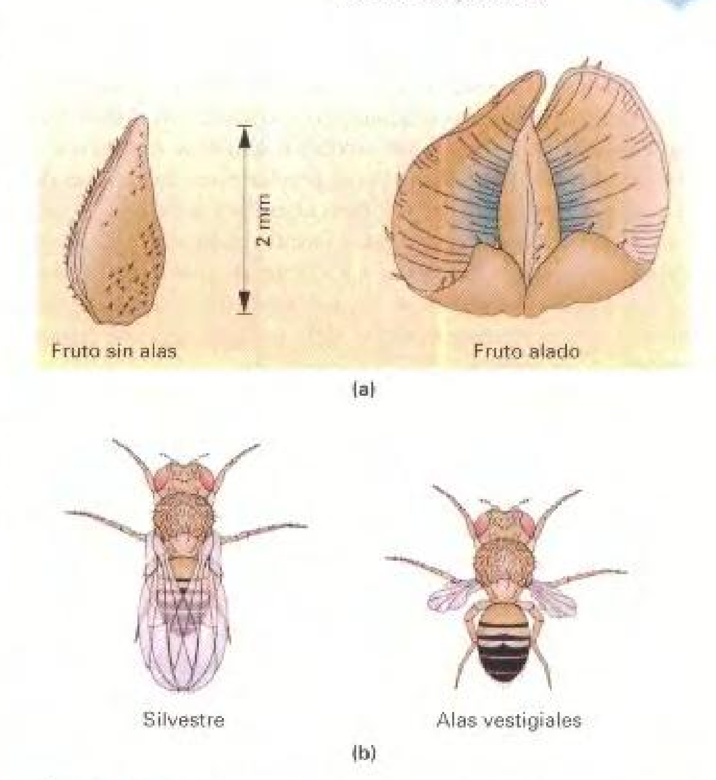


Figura 1-14. Dimorfismos. (a) Dos formas distintas de frutos de *Plectritis congesta*. Cada planta concreta produce todos sus frutos bien sin alas, bien con alas. Por lo demás, las plantas son idénticas. (b) Mutante de *Drosophila* con alas anormales y una mosca normal (silvestre) como comparación. En ambos casos, los dos fenotipos se deben a alelos de un solo gen.

En la variación discontinua, se produce una relación predecible entre genotipo y fenotipo en la mayoría de las condiciones. En otras palabras, podemos distinguir casi siempre los dos fenotipos (y sus genotipos subyacentes). En el caso del albinismo, el alelo *A* permite siempre la formación de algún pigmento, mientras que el alelo «blanco» provoca siempre el albinismo si está en homocigosis. Por esa razón, la variación discontinua ha sido empleada con éxito por los genetistas para identificar los genes subyacentes y su papel en las funciones celulares.

Los genetistas distinguen dos categorías de variación discontinua relacionadas con diferencias alélicas simples. En una población natural, la existencia de dos o más variantes discontinuas *comunes* se denomina **polimorfismo** (en griego, muchas formas) y un ejemplo aparece en la Figura 1-14*a*. Las distintas formas se denominan **morfos**. Con frecuencia, tales morfos resultan estar determinados por alelos de un solo gen. ¿Por qué aparecen polimorfismos genéticos en las poblaciones? Ciertas formas de selección natural explican algunos casos, pero en otros casos los morfos parecen ser selectivamente neutros.

Las variantes fenotípicas discontinuas raras, excepcionales, se denominan **mutantes**, mientras que el fenotipo acompañante «normal», más común, se denomina **silvestre**. La Figura 1-14*b* muestra un ejemplo de fenotipo mutante. De nuevo, los fenoti-

pos silvestre y mutante se deben, en muchos casos, a alelos de un solo gen. Los mutantes aparecen en la naturaleza de forma espontánea (los albinos, por ejemplo) o se obtienen en el laboratorio mediante tratamiento con productos químicos mutágenos o radiaciones. Los genetistas inducen regularmente mutaciones de manera artificial para llevar a cabo el análisis genético, ya que las mutaciones que afectan alguna función biológica concreta en estudio sirven para identificar a los distintos genes que inciden en esa función. Observe que los polimorfismos surgen inicialmente como mutaciones, pero el alelo mutante llega, de alguna manera, a ser común.

COROLARIO

Con frecuencia, una diferencia alélica en un solo gen puede dar lugar a formas fenotípicas discretas que facilitan el estudio del gen y la función biológica asociada al mismo.

La **variación continua** de un carácter supone la existencia en la población de un espectro ininterrumpido de fenotipos (véase la Figura 1-12). Los caracteres métricos, como la altura, el peso y el grado de pigmentación, son buenos ejemplos de tal tipo de variación. Los fenotipos intermedios suelen ser más frecuentes que los extremos, de modo que si representamos en una gráfica las frecuencias de cada fenotipo, aparece una distribución en forma de campana. En algunas de estas distribuciones toda la variación es de origen ambiental y carece de base genética alguna. En otros casos hay un componente genético debido a la variación alélica en uno o muchos genes. En la mayoría de los casos hay variación tanto de origen genético como ambiental. En las distribuciones continuas no hay una correspondencia «uno a uno» entre genotipo y fenotipo. Por ello sabemos poco sobre los genes subyacentes a la variación continua, y sólo recientemente se han desarrollado técnicas para identificarlos y caracterizarlos.

En la vida diaria es más frecuente observar variación continua que discontinua. Todos podemos citar casos de variación continua que hemos observado en poblaciones de plantas o animales, y existen muchos ejemplos en las poblaciones humanas. Un área de la Genética en la que la variación continua resulta de particular importancia es la mejora animal y vegetal. Muchos de los caracteres que son objeto de selección en los programas de mejora, como el peso de las semillas o la producción de leche, tienen una determinación compleja, y los fenotipos correspondientes varían de forma continua en las poblaciones. En dichos programas se escogen y se cruzan selectivamente aquellos animales o plantas que ocupan uno de los extremos del espectro fenotípico. Antes de llevar a cabo esa selección, es necesario saber el peso relativo de los componentes genéticos y ambientales de la variación. Volveremos a estos procedimientos especiales en el Capítulo 25, pero durante la mayor parte de este texto trataremos con genes implicados en variación discontinua.

Bases moleculares de la variación alélica

Consideremos la diferencia entre los fenotipos pigmentado y albino en humanos. El pigmento oscuro melanina tiene una estructura compleja, siendo el producto final de una ruta bioquímica de síntesis. Cada paso de la ruta supone la conversión de una molécula en otra, generándose la melanina de forma progresiva, paso a paso. Cada paso es catalizado por una proteína enzimática distinta, cifrada en un gen concreto. La mayoría de los casos de albinismo se deben a cambios en una de esas enzimas, llamada tirosinasa. La enzima tirosinasa cataliza el último paso de la ruta, la conversión de tirosina en melanina.

$$\longrightarrow \underset{\text{(incolora)}}{\text{tirosina}} \xrightarrow{\text{tirosinasa}} \underset{\text{(pigmentada)}}{\text{melanina}}$$

Para realizar esta tarea, la tirosinasa se une a su sustrato, una molécula de tirosina, y facilita los cambios moleculares necesarios para convertirla en el pigmento melanina. Se produce un encaje específico, tipo «llave-cerradura» entre la tirosina y el centro activo de la enzima. El **centro activo** es un «bolsillo» formado por varios aminoácidos críticos del polipéptido. Si el DNA del gen que determina la tirosinasa cambia de tal manera que uno de esos aminoácidos es sustituido por otro, o se pierde, las posibles consecuencias son varias. Una es que la enzima sea capaz todavía de realizar sus funciones pero de una manera menos eficiente. Tal hecho puede tener un efecto fenotípico mínimo, hasta el punto de que resulte difícil de detectar, o puede provocar una reducción significativa de la cantidad de melanina generada y, en consecuencia, una menor coloración de la piel. Observe que la proteína sigue estando presente más o menos intacta, pero su capacidad de convertir la tirosina en melanina ha sido gravemente comprometida. Otra posible consecuencia es que la enzima pierda toda capacidad funcional, en cuyo caso el hecho mutacional en el DNA del gen habría generado un alelo de albinismo, al que nos hemos referido antes como alelo *a*. Así se explica que un individuo *a/a* sea albino. El genotipo *A/a* resulta de especial interés. Provoca una pigmentación normal porque la transcripción del alelo silvestre (*A*) suministra suficiente tirosinasa para que se produzca una síntesis de melanina normal. Estos alelos que ofrecen una función aproximadamente normal cuando se encuentra una sola copia de ellos se denominan *haplosuficientes*. Los alelos aparecen a menudo como haplosuficientes, en parte porque una reducción pequeña de función no resulta vital para el organismo. Los alelos que determinan una proteína carente por completo de función se denominan **alelos nulos** y, en general, no tienen efecto en presencia de alelos funcionales (en individuos *A/a*). La base molecular del albinismo se representa en la Figura 1-15.

El hecho mutacional producido en el DNA puede ser de diversos tipos. El más simple y más frecuente es un **cambio de nucleótido**, que puede desembocar en la sustitución de un aminoácido o la aparición de codones de *stop* prematuros. Pequeñas **deleciones** o **inserciones** son también comunes. Incluso la deleción o inserción de una sola base produce un daño considerable en la proteína; como el mRNA se lee desde un extremo en grupos «en fase» de tres nucleótidos, la pérdida o ganancia de un nucleótido desplaza la fase de lectura y todos los aminoácidos incorporados «aguas abajo» del cambio serán incorrectos. Tales cambios se denominan **mutaciones de cambio de fase**.

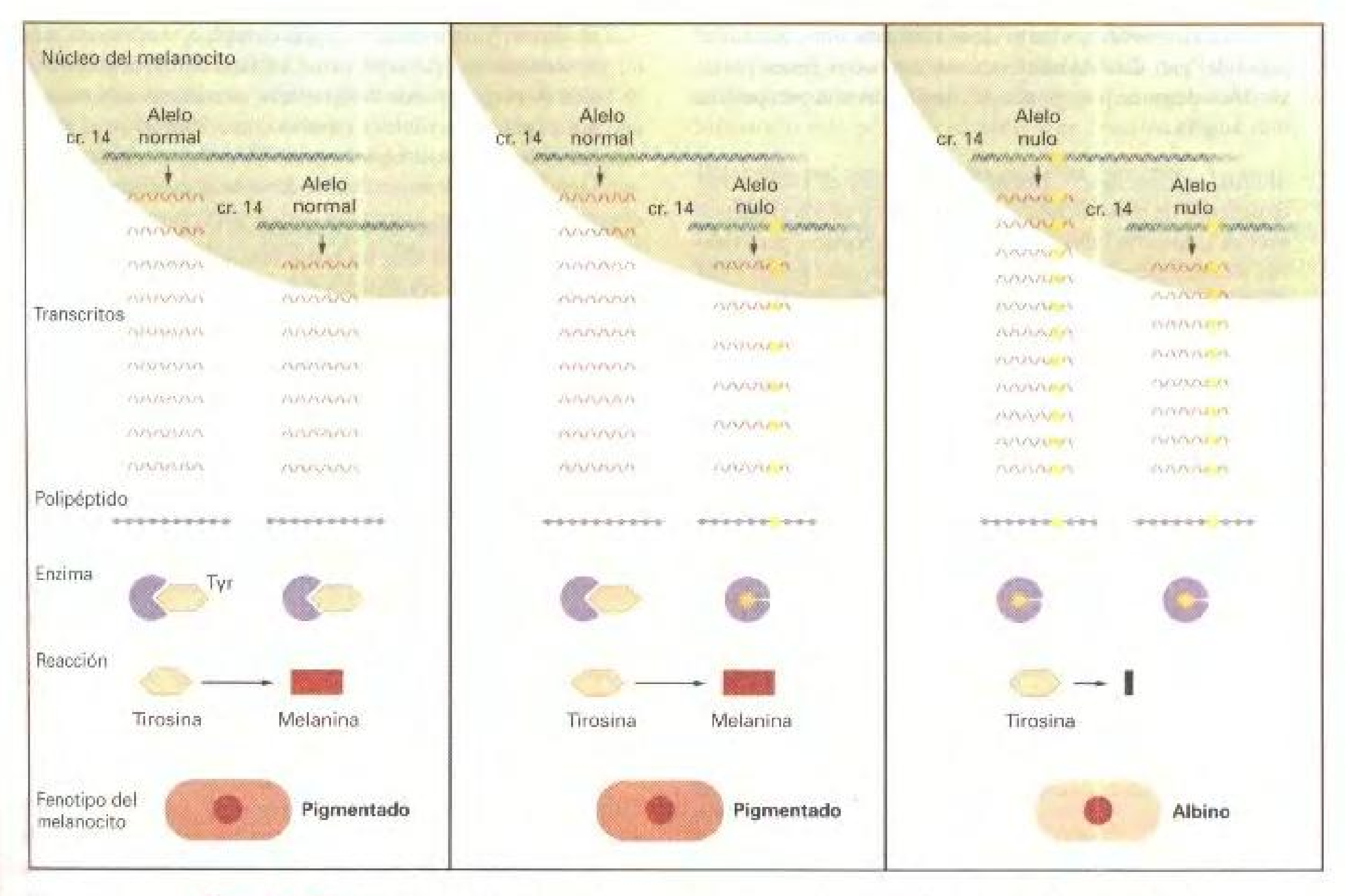


Figura 1-15. Base molecular del albinismo. Expresión génica en células que poseen 2, 1 y 0 copias del alelo normal del gen de la tirosinasa, situado en el cromosoma 14. Los melanocitos son células especializadas en producir melanina.

Las mutaciones cambian la composición aminoacídica de las proteínas. Las consecuencias más importantes son cambios en su forma y tamaño. Tales cambios de forma o tamaño pueden ocasionar la pérdida de su función biológica (que sería la base de un alelo nulo) o una cierta reducción de dicha función. Con mucha menor frecuencia, una mutación genera una función nueva del producto proteico.

COROLARIO

Un nuevo alelo aparecido por mutación puede dar lugar a la pérdida completa de función de la proteína, a una cierta merma de dicha función o a la aparición de una función nueva.

Métodos utilizados en Genética

Estudiar los genes ha demostrado ser un ejercicio muy eficaz para entender los sistemas biológicos. Como los genes afectan virtualmente a todos los aspectos de la estructura y función de un organismo, ser capaces de identificar y determinar la función de los genes y de las proteínas cifradas en ellos es un paso importante para reconocer y conectar los distintos procesos subyacentes al carácter particular en estudio. Es importante señalar que los genetistas no estudian sólo los mecanismos de la herencia, sino *todos* los mecanismos biológicos. Se emplean muchos métodos distintos para estudiar los genes y las actividades génicas, y tales métodos pueden resumirse como sigue:

1. *Aislamiento de mutantes afectados en el proceso en estudio.* Cada uno de los genes mutantes revela un componente genético del proceso, y todos juntos muestran el espectro de proteínas que actúan conjuntamente en tal proceso específico.

2. *Análisis de los descendientes de cruzamientos controlados entre mutantes y otras variantes discontinuas.* Este tipo de análisis permite identificar a los genes y sus alelos, sus posiciones cromosómicas y sus formas de herencia. Estos métodos se discutirán en el Capítulo 2.

3. *Análisis bioquímico de los procesos celulares controlados por los genes.* La vida es, básicamente, un complicado conjunto de reacciones químicas; así que estudiar las formas en que los genes controlan dichas reacciones es una vía para diseccionar esa química tan compleja. Los alelos mutantes que provocan un defecto funcional (véase método 1) son de gran valor en este tipo de análisis. La estrategia básica es descubrir cómo ha sido afectada la química celular en el

individuo mutante y, a partir de esa información, deducir el papel del gen. Las deducciones sobre muchos genes se ensamblan después para poner de manifiesto una perspectiva más amplia.

4. *Análisis microscópico.* Desde hace tiempo, el estudio microscópico de la estructura y el movimiento de los cromosomas ha sido parte integrante del análisis genético, pero nuevas técnicas permiten ahora marcar los propios genes y sus productos, de manera que pueda establecerse fácilmente su localización, de manera visual, al microscopio.

5. *Análisis directo del DNA.* Como el material genético es DNA, la caracterización última es el análisis del propio DNA. Se emplean muchos métodos, incluyendo el de la clonación. Éste es un procedimiento por el que un gen concreto es aislado y reproducido (copiado muchas veces) para generar una muestra pura que poder analizar. Una vez obtenido el clon de un gen, puede determinarse su secuencia de nucleótidos y, por tanto, obtener información crítica sobre su estructura y función. Además, los genes clonados se emplean como «sondas biológicas», como se describe a continuación.

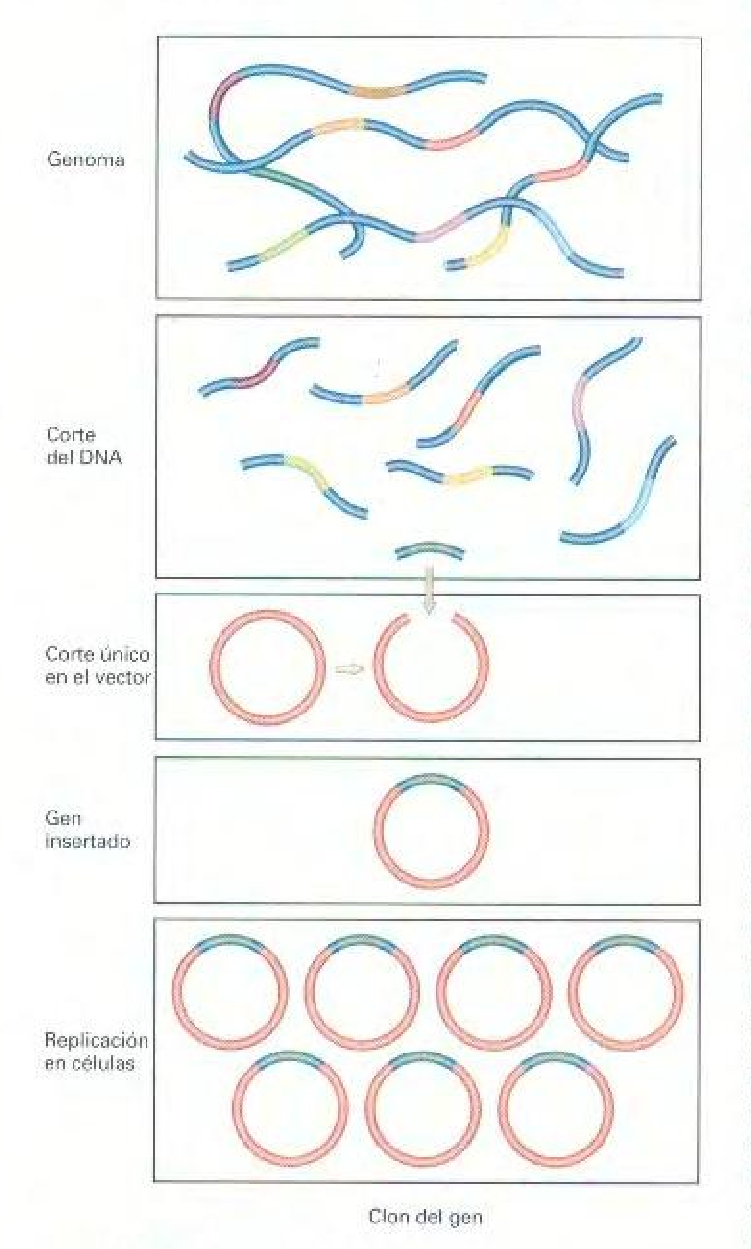


Figura 1-16. Estrategia básica de la clonación.

La clonación se describirá en detalle en los Capítulos 12, 13 y 14, pero es necesario aquí un breve resumen para que podamos referirnos a ciertos conceptos en capítulos previos a esos. La clonación se lleva a cabo insertando el gen que queremos reproducir en un pequeño cromosoma auxiliar y dejando que este cromosoma haga el trabajo de replicar y amplificar al fragmento «viajero». El cromosoma pequeño recibe el nombre de **vector** o transportador. Unos vectores empleados con frecuencia son los plásmidos, moléculas extras, no esenciales, de DNA que se encuentran de forma natural en las bacterias. El DNA de cualquier organismo puede ser insertado en un vector; la construcción híbrida se introduce en una célula bacteriana, a partir de la cual se obtiene un cultivo voluminoso (Fig. 1-16). El vector y su inserto pueden extraerse tras rotura de las células y ser estudiados de manera apropiada.

Detección de moléculas concretas de DNA, RNA y proteína

Como las moléculas de interés en Genética son DNA, RNA y proteínas, el análisis genético requiere a menudo la detección de moléculas concretas de cada uno de esos tipos. ¿Cómo podemos identificar una molécula específica entre los miles de tipos distintos presentes en la célula? El método más empleado para detectar macromoléculas concretas presentes en una mezcla es el **sondeo**. Este método aprovecha la especificidad de la unión entre moléculas que ya hemos encontrado varias veces. La sonda es marcada de alguna manera, bien con un átomo radiactivo o bien con un compuesto fluorescente, de manera que podamos detectar con facilidad el sitio al que se haya unido. Veamos algunas sondas para DNA, RNA y proteína.

Detección por sondeo de un DNA concreto. Un gen clonado sirve como sonda para encontrar segmentos de DNA que tienen la misma secuencia o similar. Por ejemplo, si se ha clonado el gen *G* de un hongo, puede ser de interés determinar si las plantas poseen el mismo gen. El empleo como sonda de un gen clonado nos lleva de nuevo al principio de la complementariedad de las bases. La sonda funciona mediante el principio de que, en solución, el movimiento aleatorio de las moléculas de esa sonda les permite encontrar secuencias complementarias y unirse a ellas. El experimento debe llevarse a cabo con cadenas separadas de DNA, para que los sitios de unión de las bases estén desocupados. Extraeríamos DNA de la planta y lo cortaríamos con uno de los muchos tipos disponibles de **enzimas de restricción**, que cortan el DNA en secuencias dianas específicas de cuatro o más bases. Las dianas se encuentran en las mismas posiciones en todas las células de la planta, así que la enzima corta el genoma en poblaciones definidas de fragmentos de tamaños específicos. Estos fragmentos se separan mediante electroforesis.

La electroforesis separa una población de fragmentos de ácidos nucleicos por su tamaño. La mezcla cortada se coloca en un pequeño bolsillo de una lámina gelatinosa (un gel), y el gel se somete a un potente campo eléctrico. La electricidad hace que las moléculas se muevan a través del gel, a velocidades inversamente proporcionales a su tamaño. Tras su separación, los fragmentos son transferidos a una membrana porosa, manteniendo sus mismas posiciones relativas. Este procedimiento se conoce como **técnica de Southern**. Después de ser calentada, para fijar el DNA y separar sus cadenas, la membrana se sumerge en una solución de la sonda. Esta sonda, de una sola cadena, encontrará y se unirá a sus secuencias complementarias de DNA. Por ejemplo,

TAGGCATCG	Sonda
ACTAATCCATAGCTTA	Fragmento genómico

Esta unión concentra la sonda en una banda de la membrana, como se muestra en la Figura 1-17*a*.

Detección por sondeo de un RNA concreto. Con frecuencia, resulta necesario determinar si un gen está siendo transcrito en algún tejido. Ello puede realizarse mediante una modificación de la técnica de Southern. Se extrae el mRNA total del tejido, se fracciona electroforéticamente y se transfiere a una membrana (este procedimiento se conoce como **técnica de Northern**). Se emplea como sonda el gen clonado, cuyo marcaje pondrá de manifiesto, si está presente, al mRNA en cuestión (Fig. 1-17*b*).

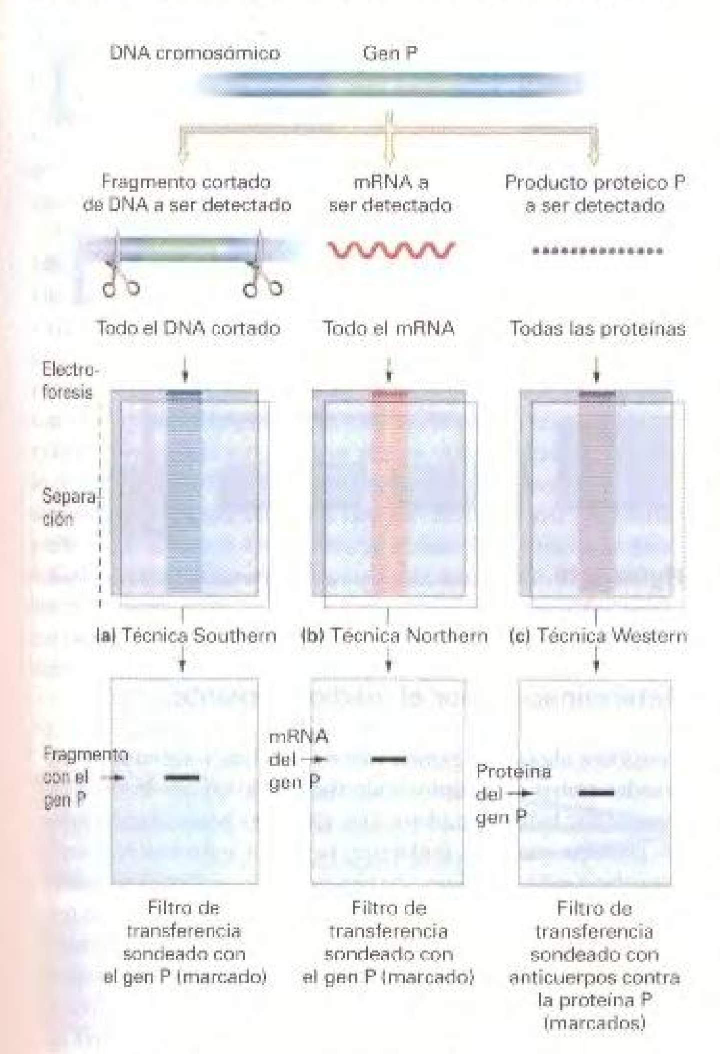


Figura 1-17. Sondeo de mezclas de DNA, RNA y proteínas.

Detección por sondeo de una proteína concreta. La detección de proteínas se lleva a cabo normalmente mediante anticuerpos, ya que un anticuerpo encaja específicamente con su antígeno, como una llave y su cerradura. La mezcla de proteínas se somete a electroforesis y se transfiere a una membrana (procedimiento conocido como **técnica de Western**). La posición sobre la membrana de la proteína concreta se pone de manifiesto sumergiendo dicha membrana en una solución del anticuerpo, obtenido de un conejo que fue inyectado con la proteína. La posición de la proteína se revela por el marcaje que lleva el anticuerpo (Fig. 1-17*c*).

Genes, medio ambiente y ser vivo

El resultado neto de la expresión de un gen es la formación de una proteína que tiene una de dos funciones básicas, según el gen de que se trate. Puede ser una **proteína estructural** que contribuye a las propiedades físicas de la célula o el organismo. Algunos ejemplos serían las proteínas del microtúbulo, del músculo o del cabello. Alternativamente, puede tratarse de una **enzima** que cataliza una de las reacciones químicas de la célula. Por tanto, al estar en ellos cifradas las proteínas, los genes determinan dos aspectos importantes de la estructura y función biológicas. Sin embargo, los genes no dictan ellos solos la estructura de un ser vivo. El otro elemento crucial del sistema es el medio ambiente. Éste influye de muchas formas sobre la actividad génica, como iremos viendo en los capítulos siguientes. No obstante, en esta presentación conviene resaltar que el medio ambiente suministra la materia prima de los procesos de síntesis controlados por los genes. Por ejemplo, los animales obtienen varios aminoácidos para sus proteínas como parte de su dieta. Gran parte de la síntesis química de las células vegetales emplea átomos de carbono obtenidos del aire, en forma de dióxido de carbono. Bacterias y hongos absorben de su medio muchas sustancias que emplean simplemente como esqueletos carbonados o nitrogenados, convertidos luego por sus enzimas en elementos constituyentes de la célula viva. Así pues, mediante la acción de los genes, un ser vivo genera el proceso ordenado que llamamos vida a partir de materiales desorganizados del medio ambiente.

Determinación genética

De nuestro breve repaso a la acción génica, podemos concluir que los seres vivos movilizan los compuestos químicos del mundo que les rodea y los transforman en su propia materia viva. Una bellota se convierte en una encina, empleando en ello sólo agua, oxígeno, dióxido de carbono, algunos compuestos inorgánicos del suelo y energía luminosa.

Una bellota se convierte en una encina, mientras que la espora de un musgo se transforma en un musgo, aunque ambos crezcan codo a codo en el mismo bosque. Las dos plantas resultantes de estos procesos de desarrollo se parecen a sus progenitoras y difieren entre sí, a pesar de que ambas tienen acceso al mismo

magro conjunto de elementos inorgánicos del medio. Los progenitores trasmiten a sus descendientes instrucciones precisas para formar células vivas a partir de materiales del medio. Estas instrucciones se encuentran en el óvulo fecundado, en forma de genes. Como consecuencia de la información de los genes, la bellota se desarrolla como una encina y la espora del musgo se convierte en un musgo.

Justo en la forma que los genes responden de las diferencias entre especies como la encina y el musgo, así dan cuenta también de las diferencias dentro de una misma especie. Considérense las plantas de la especie *Plectritis congesta*. Doquiera que crecen estas plantas en la naturaleza, se encuentran dos formas de la especie: una forma tiene frutos sin alas y la otra tiene frutos alados (véase Fig. 1-14*a*). Estas plantas se autopolinizan, y podemos observar los descendientes que se producen de esa autofecundación cuando se cultivan en condiciones uniformes en un invernadero; normalmente, observamos que los descendientes de la autofecundación de una planta de frutos alados producen todos frutos con alas, en tanto que los descendientes de la autofecundación de una planta de frutos sin alas producen todos frutos sin alas. Puesto que todos ellos se cultivaron en el mismo medio, podemos descartar la posibilidad de que sean diferencias ambientales las responsables de que unas plantas tengan frutos sin alas y otras con alas. Podemos concluir, sin temor a equivocarnos, que la diferencia en la forma del fruto de las plantas originales, que cada una transmitió a los descendientes de su autofecundación, se debe a los diferentes genotipos. Puede demostrarse que los morfos «alado» y «sin alas» se deben a los alelos de un solo gen.

Plectritis produce dos formas heredables, ambas perfectamente normales. La decisiva influencia de los genes se manifiesta quizás con mayor frecuencia en diferencias en las que una de las formas es normal y la otra anormal. Un buen ejemplo es la anemia falciforme, enfermedad hereditaria humana. La causa subyacente de la enfermedad es una variante de la hemoglobina, la proteína transportadora de oxígeno de los glóbulos rojos. Las personas normales poseen un tipo de hemoglobina llamada *hemoglobina A*, cuya información está cifrada en un gen. Un cambio molecular minúsculo en el DNA de este gen tiene como consecuencia la aparición de una hemoglobina ligeramente alterada, llamada *hemoglobina S*. Para las personas que poseen sólo hemoglobina S, el desenlace final de este pequeño cambio es una grave enfermedad y, normalmente, el fallecimiento. El gen produce su impacto en el organismo mediante un complejo «efecto cascada» resumido en la Figura 1-18.

Observaciones como éstas conducen al modelo de interacción entre genes y medio ambiente que se muestra en la Figura 1-19. En este modelo, los genes actúan como un conjunto de instrucciones que transforman materiales más o menos indiferenciados del medio ambiente en un organismo específico, del mismo modo que un plano determina de qué forma será levantada una casa a partir de los materiales básicos de construcción. Según cada plano particular, los mismos ladrillos, hormigón, madera y clavos servirán para construir una casa de tejado en punta o una casa de tejado plano. Tal modelo implica que los genes son los elementos decisivos en la determinación de los organismos; el medio ambiente aporta simplemente materias primas desorganizadas.

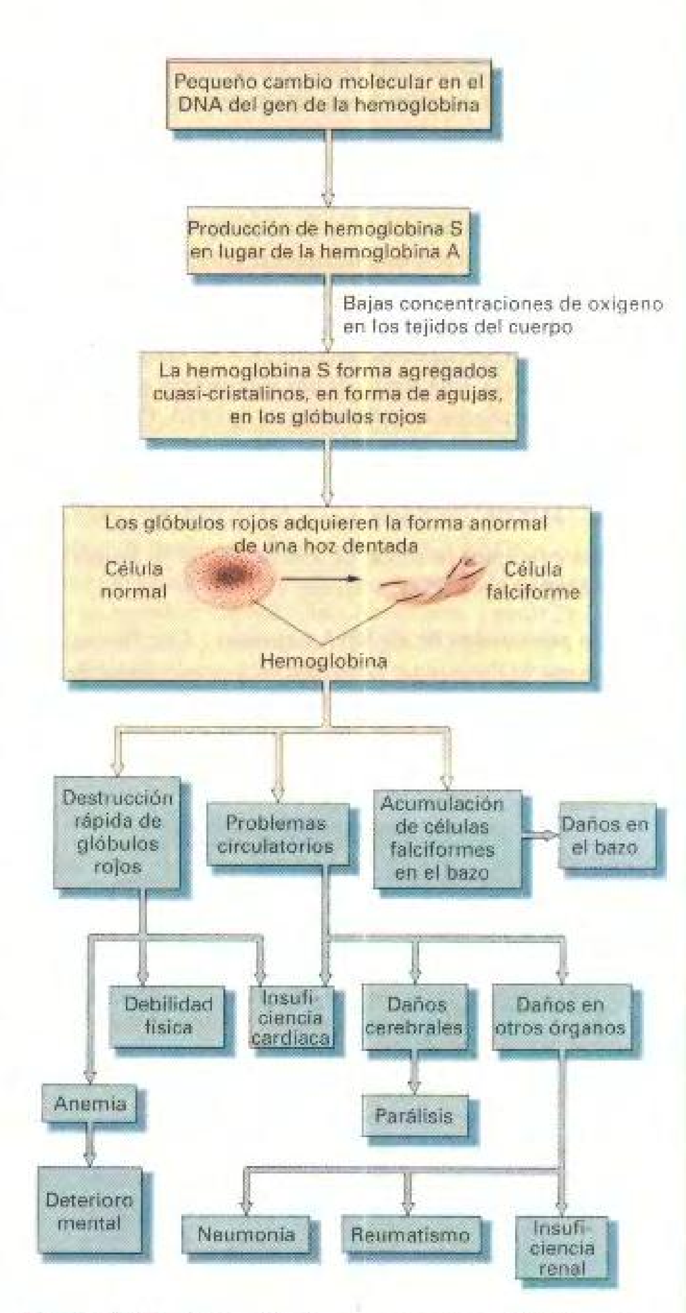


Figura 1-18. Cascada de hechos que provocan la anemia falciforme humana.

Determinación por el medio ambiente

Considere ahora dos gemelas monocigóticas («idénticas»), originadas ambas de un solo óvulo fecundado que se dividió y dio lugar a dos bebés completos con idénticos genes. Suponga que las gemelas nacen en Inglaterra, pero son separadas al nacer y enviadas a países distintos. Si una es criada en China, por padres adoptivos que hablan chino, hablará chino, mientras que su hermana, criada en Budapest, hablará húngaro. Cada una adoptará las costumbres y valores culturales de su medio. Aunque iniciaron su vida con idénticas propiedades genéticas, los distintos ambientes culturales en los que vivieron generaron diferencias entre las hermanas (y entre ellas y sus padres biológicos). En este caso, las

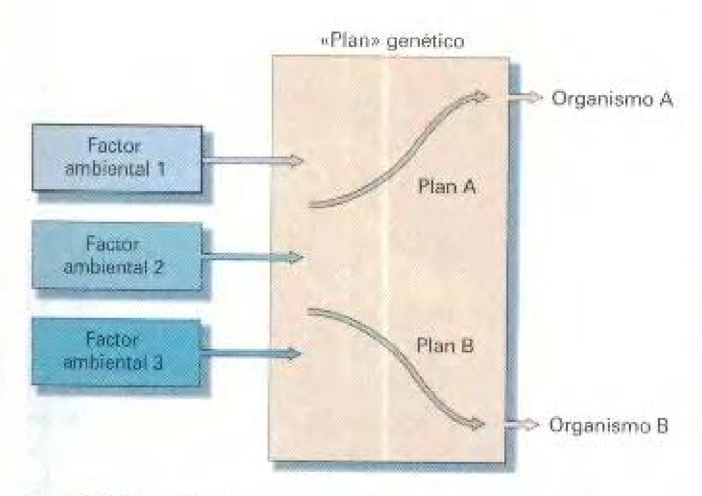


Figura 1-19. Modelo de determinación que resalta el papel de los genes.

diferencias se deben obviamente al medio ambiente y los efectos genéticos tienen escasa importancia en su determinación.

Este ejemplo sugiere el modelo de la Figura 1-20, inverso del que aparece en la Figura 1-19. En el modelo de la Figura 1-20, los genes inciden en el sistema para darle ciertas normas generales de desarrollo, pero es el medio ambiente quien determina el curso real de la acción. Imagine un conjunto de instrucciones para levantar una casa que hablaran simplemente de «suelo para soportar 300 kilos por metro cuadrado», o «paredes con un factor de aislamiento de 45 cm»; el aspecto real y otras características de la estructura estarían condicionados por los materiales de obra disponibles.

Nuestros distintos ejemplos —el del efecto exclusivamente genético versus el del efecto ambiental— conducen a dos modelos muy distintos. Considere primero el modelo de las semillas: dado un par de semillas y un medio de crecimiento uniforme, seríamos incapaces de predecir los futuros patrones de desarrollo sólo a partir del conocimiento del medio. En cualquier ambiente que podamos imaginar, si llegan a desarrollarse, la bellota se transformará en una encina y la espora en un musgo. Aquí se aplica el modelo de la Figura 1-19. En segundo lugar, mire las gemelas: ningún dato sobre el conjunto de genes que han heredado nos permitiría predecir qué idioma y estilo cultural acabarán manifestando. Dos individuos *genéticamente diferentes* se desarrollan de distinta forma en el *mismo medio*, pero dos individuos *genéticamente idénticos* pueden también desarrollarse de diferente forma en *ambientes distintos*. Se aplica aquí el modelo de la Figura 1-20.

En general, tratamos con organismos que difieren tanto en sus genes como en su medio ambiente. Si queremos predecir en qué forma se desarrollará un ser vivo, debemos conocer primero la constitución genética heredada de sus padres. Luego, debemos conocer la sucesión histórica de ambientes a los que el organismo en desarrollo ha estado expuesto. Desde que nace hasta que muere, cada ser vivo tiene su propia historia de desarrollo. Qué será de un organismo en el momento siguiente depende críticamente tanto del ambiente que encuentre en ese momento siguiente como de su condición actual. Es importante para un organismo no sólo qué ambientes encuentra, sino en qué orden se tropieza con ellos. A 20 °C, la mosca del vinagre (*Drosophila*) se desarrolla normalmente. Si la temperatura se eleva hasta 37 °C durante un breve período de tiempo, en la etapa inicial de su estado de desarrollo de pupa, faltarán en la mosca adulta partes del patrón normal de venas de sus alas. Sin embargo, si ese «choque térmico» se administra sólo 24 horas después, la mosca desarrolla el patrón normal de venas. La Figura 1-21 muestra un modelo general en el que genes y medio ambiente determinan conjuntamente (mediante algunas reglas de desarrollo) las características reales de un organismo.

COROLARIO

Conforme un organismo va pasando, mediante el desarrollo, de un estado a otro, sus genes interaccionan con su medio ambiente en cada momento de su historia vital. Es esta acción conjunta de genes y medio ambiente la que determina cómo son realmente los seres vivos.

Uso de genotipo y fenotipo

En esta sección se presentan algunos términos útiles que los genetistas han creado en su estudio de cómo interaccionan genes y medio ambiente para dar lugar a un ser vivo.

Un organismo típico se parece más a sus progenitores que a otros individuos no emparentados con él. Así, frecuentemente nos expresamos como si fueran las características del individuo las que se heredaran en sí mismas: «tiene la inteligencia de su madre» o «ha heredado la diabetes de su padre». Pero nuestra discusión anterior demuestra que tales manifestaciones son incorrectas. «Su inteligencia» y «su diabetes» se han desarrollado a través de una larga sucesión de hechos en la historia vital de la persona, y en esa sucesión han participado tanto los genes como el ambiente. En un sentido biológico, los individuos sólo here-

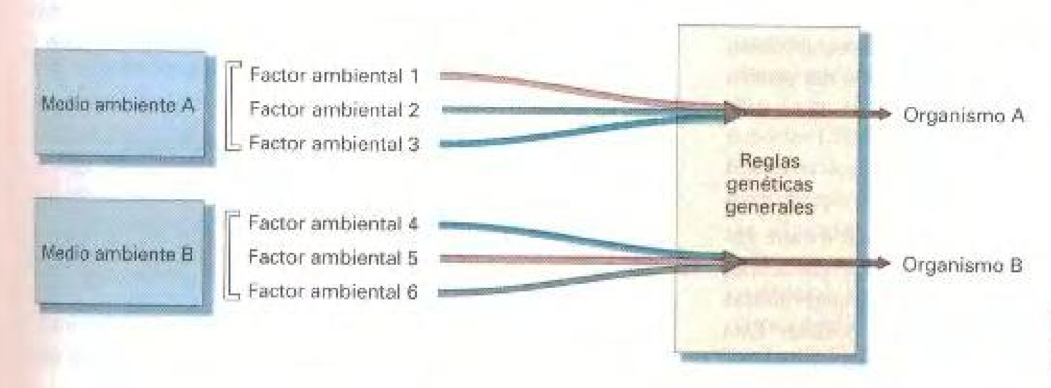


Figura 1-20. Modelo de determinación que resalta el papel del medio ambiente.

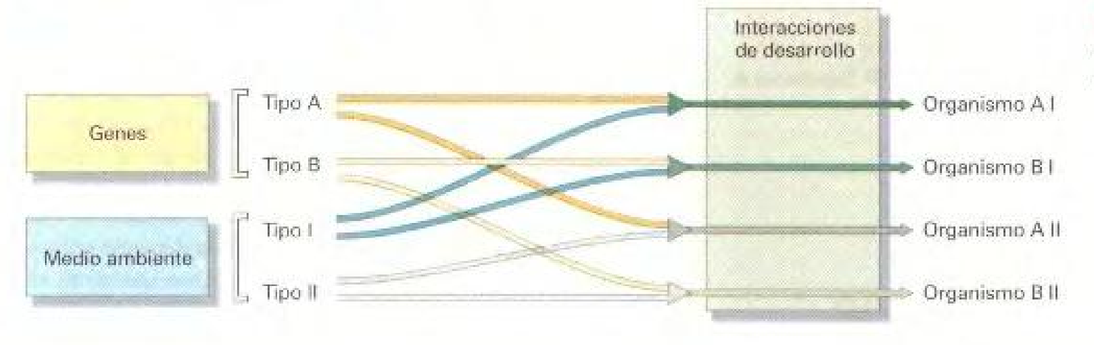


Figura 1-21. Modelo de determinación que resalta la acción conjunta de genes y medio ambiente.

dan las estructuras moleculares del cigoto a partir del que se desarrollan. Los individuos heredan sus genes, no los resultados finales de su desarrollo histórico particular.

Para evitar tal confusión entre los genes (que se heredan) y los resultados visibles del desarrollo (que no se heredan), los genetistas hacen una distinción fundamental entre el genotipo y el fenotipo de un organismo. Dos individuos son del mismo genotipo si poseen el mismo conjunto de genes. Dos individuos son del mismo fenotipo si son iguales físicamente o actúan de la misma manera.

En términos estrictos, el genotipo describe el conjunto completo de los genes heredados por un individuo, y el fenotipo describe todos los aspectos morfológicos, fisiológicos, de conducta y de relaciones ecológicas. En este sentido, dos individuos no comparten nunca el mismo fenotipo, porque entre ellos siempre existe alguna diferencia morfológica o fisiológica (por pequeña que sea). Más aún, dos individuos cualesquiera difieren al menos un poco en su genotipo, exceptuando aquellos que proceden de otro por reproducción asexual. En la práctica, los términos *genotipo* y *fenotipo* se emplean en un sentido más restringido. Hablamos de algún aspecto parcial del fenotipo (por ejemplo, el color de ojos) y de algún subconjunto del genotipo (por ejemplo, los genes que determinan la pigmentación del ojo).

COROLARIO

Cuando empleamos los términos *fenotipo* y *genotipo*, estamos hablando generalmente de «fenotipo parcial» y «genotipo parcial», y especificamos uno o varios rasgos y genes concretos que nos interesan.

Nótese una diferencia importante entre genotipo y fenotipo: el genotipo es una característica de un organismo individual esencialmente fija; el genotipo permanece invariable a lo largo de la vida y es prácticamente inmodificable por efectos ambientales. La mayoría de los fenotipos cambian continuamente a lo largo de la vida de un organismo, conforme sus genes interaccionan con una serie de ambientes sucesivos. La persistencia del genotipo no implica persistencia del fenotipo.

La norma de reacción

¿Podemos determinar de forma cuantitativa la relación entre genotipo, medio ambiente y fenotipo? Dado un genotipo particular, podríamos elaborar una tabla con los fenotipos que aparecen tras el desarrollo de ese genotipo en todos los ambientes posibles. Esta tabulación de las relaciones medio ambiente-fenotipo para un genotipo determinado se denomina la **norma de reacción** de ese genotipo. Desde luego, no podemos hacer esa tabulación en la práctica más que para un genotipo parcial, un fenotipo parcial y algunos factores particulares del medio ambiente. Por ejemplo, podemos concentrarnos en el tamaño de los ojos que tendrán las moscas del vinagre que se desarrollen a distintas temperaturas constantes; podríamos hacerlo con diferentes genotipos para el tamaño de los ojos y obtener así la norma de reacción de la especie.

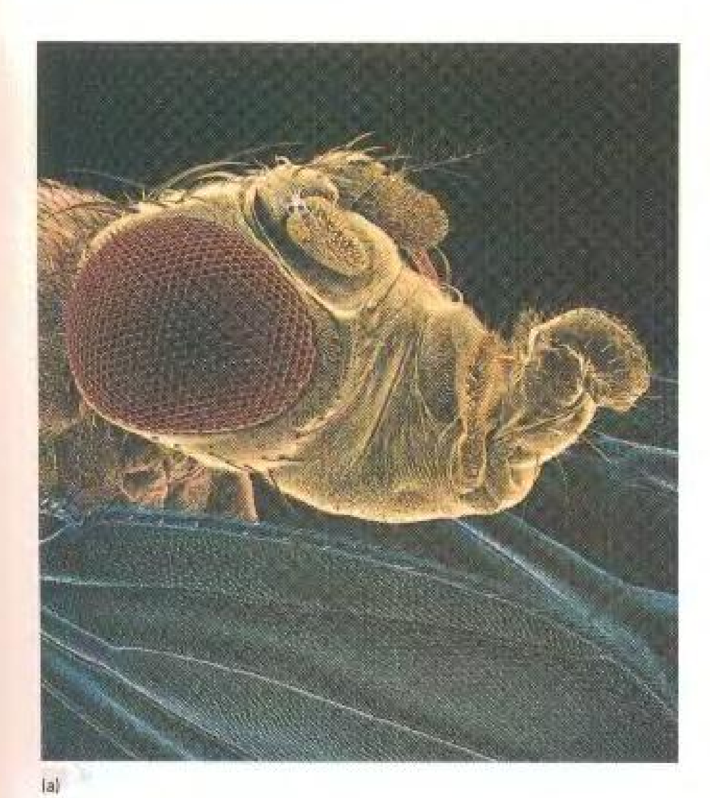
La Figura 1-22 muestra precisamente tales normas de reacción de tres genotipos parciales distintos de la mosca *Drosophila melanogaster*. Una gráfica es un resumen conveniente de los datos, más extensos, de una tabla. El tamaño del ojo de las moscas se ha medido contando el número de sus facetas individuales, o células. En el eje de ordenadas se representa el número de facetas (en una escala logarítmica) y en el eje de abscisas la temperatura a la que se desarrollaron las moscas.

Tres normas de reacción aparecen en la gráfica. Si criamos moscas de genotipo *silvestre*, característico de las moscas de poblaciones naturales, a temperaturas altas, desarrollan ojos algo menores que los de las moscas silvestres criadas a temperaturas más bajas. La gráfica nos muestra que los fenotipos silvestres varían desde algo más de 700 facetas hasta 1000 facetas —la norma de reacción silvestre—. Una mosca de genotipo *ultrabar* tiene ojos más pequeños que las moscas silvestres, con independencia de la temperatura a la que se desarrollen. La temperatura ejerce un efecto mayor sobre el desarrollo de los genotipos *ultrabar* que sobre los silvestres, como podemos apreciar por la pendiente de la norma de reacción *ultrabar*, más pronunciada que la del silvestre. Cualquier mosca de genotipo *infrabar* tiene también ojos más pequeños que cualquier mosca silvestre, pero la temperatura tiene el efecto contrario sobre las moscas de ese genotipo: las moscas *infrabar* criadas a temperaturas más altas tienden a desarrollar ojos más grandes que las criadas a temperaturas más bajas. Estas normas de reacción ponen de manifiesto que, más que simple, la relación entre genotipo y fenotipo es compleja.

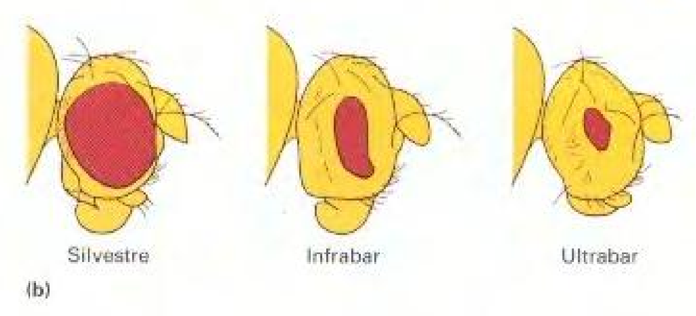
COROLARIO

Un genotipo particular puede producir diferentes fenotipos, dependiendo del medio ambiente en que se desarrollen los organismos. También dependiendo del medio ambiente, varios genotipos distintos pueden producir el mismo fenotipo.

Si sabemos que una mosca es de genotipo silvestre, esta información no es suficiente por sí sola para saber si su ojo tiene 800



(a)



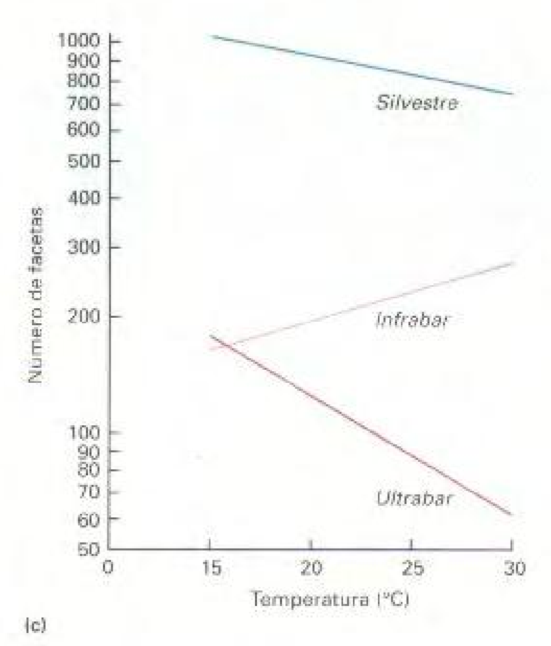


Figura 1-22. Normas de reacción a la temperatura de tres genotipos distintos para el tamaño de ojo de *Drosophila*. (a) Ampliación fotográfica de un ojo normal compuesto por centenares de unidades elementales denominadas *facetas*. El tamaño del ojo está determinado por el número de facetas. (b) Tamaños relativos de ojos de moscas silvestres, *infrabar* y *ultrabar* criadas a la temperatura más alta del rango de temperaturas probadas. (c) Líneas representativas de las normas de reacción de los tres genotipos. (Parte a, Don Rio y Sima Misra, University of California, Berkeley).

ó 1000 facetas. Por otro lado, sabiendo que una mosca tiene 170 facetas no podemos decir si su genotipo es *ultrabar* o *infrabar*. Ni siquiera podemos extraer una conclusión general sobre el efecto de la temperatura sobre el tamaño del ojo de *Drosophila*, porque resulta ser opuesto para dos genotipos distintos. En la Figura 1-22 podemos apreciar sin ambigüedad algunas diferencias de fenotipo entre distintos genotipos, no importa cuál sea el ambiente: cualquier mosca silvestre tiene ojos más grandes que cualquier mosca *ultrabar* o *infrabar*. Pero las expresiones fenotípicas de otros genotipos se superponen: los ojos de una mosca *ultrabar* pueden ser mayores o menores que los de una mosca *infrabar*, según la temperatura a la que se desarrollen los individuos.

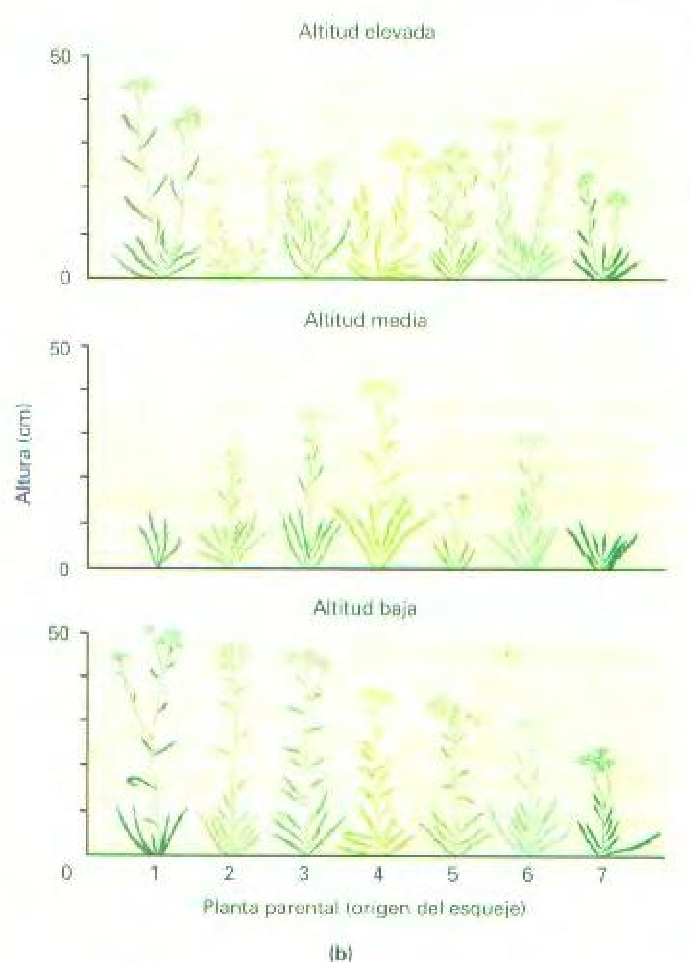
Para obtener una norma de reacción como la de la Figura 1-22, debemos hacer que varios individuos de idéntico genotipo se desarrollen en ambientes distintos. La realización de estos experimentos requiere la obtención de muchos huevos del mismo genotipo. Por ejemplo, para estudiar un genotipo humano en diez ambientes diferentes, tendríamos que conseguir hermanos genéticamente idénticos y controlar que cada uno de ellos se desarrollase en uno de esos ambientes. Sin embargo, tal cosa no es posible, ni biológicamente ni éticamente. Por ahora, no conocemos la norma de reacción de ningún genotipo humano en ninguna serie de condiciones ambientales. Ni parece claro en qué forma podremos adquirir algún día esa información, sin realizar manipulaciones indeseables de los seres humanos.

Existen métodos genéticos especiales que permiten reproducir genotipos de unos pocos organismos de experimentación, y determinar así sus normas de reacción. Tales estudios son particularmente sencillos con las plantas que pueden reproducirse vegetativamente (o sea, por esquejes). Trozos cortados de una misma planta son todos del mismo genotipo; así que los descendientes obtenidos por ese procedimiento son todos genotípicamente idénticos. Un estudio de este tipo se ha realizado con la planta *Achillea millefolium* (Fig. 1-23*a*). Los resultados experimentales se ofrecen en la Figura 1-23*b*. Se colectaron muchas plantas, y se tomaron tres esquejes de cada una de ellas. Un esqueje de cada planta se plantó a baja altitud (30 metros sobre el nivel del mar), otro a una altitud intermedia (1400 metros) y otro a una altitud superior (3050 metros). La Figura 1-23*b* muestra los individuos maduros desarrollados a partir de los esquejes de siete plantas; para compararlos mejor, las tres plantas del mismo genotipo están alineadas verticalmente en la figura.

En primer lugar, notamos un efecto promedio del ambiente: en general, las plantas crecieron mal a la altitud intermedia. No obstante, ello no es así para todos los genotipos: los esquejes de la planta 4 crecieron mejor a la altitud intermedia. En segundo



(a)



(b)

Figura 1-23. (a) *Achillea millefolium*. (b) Normas de reacción frente a la altitud de siete plantas distintas de *Achillea* (siete genotipos distintos). Un esqueje de cada planta se cultivó a altitud baja, intermedia o alta. (Parte a, Harper Horticultural Slide Library; parte b, Carnegie Institution of Washington.)

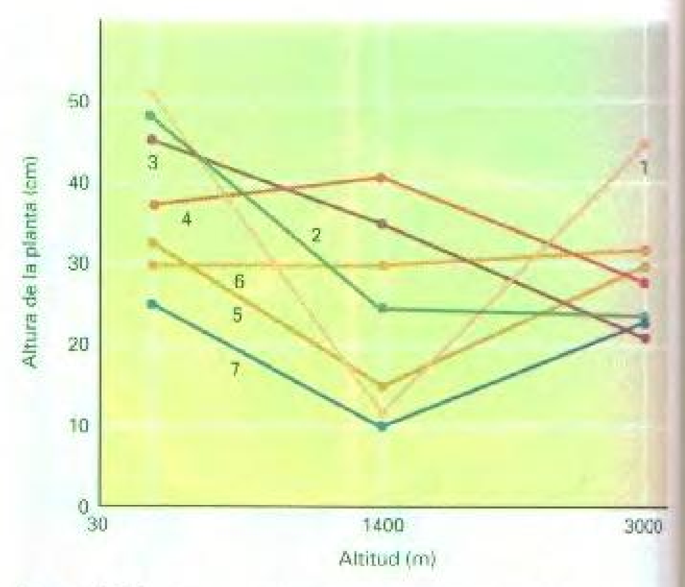


Figura 1-24. Representación gráfica del conjunto completo de datos del tipo mostrado en la Figura 1-23. Cada línea representa la norma de reacción de una planta.

lugar, podemos apreciar que ningún genotipo es incondicionalmente superior en crecimiento a otro. La planta 1 fue la que mejor creció a las altitudes baja y alta, pero fue la que creció peor a la altitud intermedia. La planta 6 fue la segunda peor en crecimiento a baja altitud y la segunda mejor a altitud elevada. Una vez más, comprobamos la compleja relación existente entre genotipo y fenotipo. En la Figura 1-24 se representan gráficamente las normas de reacción obtenidas de los datos de la Figura 1-23*b*. Cada genotipo manifiesta una norma de reacción distinta, y las diferentes normas de reacción se cruzan unas con otras, de manera que no podemos escoger el «mejor» genotipo, ni el «mejor» medio ambiente para el crecimiento de *Achillea*.

Hemos visto dos patrones distintos de normas de reacción. Entre el genotipo silvestre y los otros genotipos para el tamaño de los ojos de *Drosophila* hay una diferencia tal que los fenotipos correspondientes muestran una distinción persistente, con independencia del medio ambiente. Como cualquier mosca de genotipo silvestre tiene ojos más grandes que cualquiera de otro genotipo, podemos hablar (de forma imprecisa) de genotipo «ojo grande» y genotipo «ojo pequeño». En este caso, la diferencia de fenotipo entre distintos genotipos es mucho mayor que la variación dentro de un mismo genotipo provocada por el desarrollo en ambientes distintos. Pero la variación que manifiesta un mismo genotipo de *Achillea* en diferentes ambientes es tan grande que las normas de reacción se cruzan unas con otras y no forman un patrón consistente. En este segundo caso, no tiene sentido que asociemos un genotipo a un fenotipo concreto, excepto en términos de respuesta a ambientes determinados.

Ruido de desarrollo

Hemos considerado hasta ahora que el fenotipo viene determinado inequívocamente por la acción conjunta de un genotipo y un ambiente específicos. Pero una mirada atenta nos permitiría observar otras variaciones no explicadas. Según la Figura 1-22, una

mosca *Drosophila* de genotipo silvestre y criada a 16 °C tiene 1000 facetas en cada ojo. En realidad, éste es un valor promedio; una mosca criada a 16 °C puede tener 980 facetas y otra 1020. Quizás estas pequeñas fluctuaciones se deban a ligeras variaciones en el medio ambiente local o a ligeras diferencias genotípicas. Sin embargo, un recuento típico puede demostrar que una mosca tiene, por ejemplo, 1017 facetas en el ojo izquierdo y 982 en el ojo derecho. En otra mosca, el ojo izquierdo tiene unas pocas facetas menos que el ojo derecho. Pero los ojos izquierdo y derecho de la misma mosca son genéticamente idénticos. Además, en condiciones experimentales normales, la mosca se desarrolla como una larva (de unos pocos milímetros de longitud) sumergida en una comida artificial homogénea, dentro de un frasco de laboratorio, y completa su desarrollo como pupa (también de pocos milímetros) pegada verticalmente al cristal interior, muy por encima de la superficie de la comida. Seguramente, el ambiente no difiere de forma significativa de un lado a otro de la mosca. Si los dos ojos son genéticamente idénticos y han experimentado la misma sucesión de ambientes, ¿por qué entonces se produce diferencia fenotípica alguna entre el ojo izquierdo y el derecho?

Las diferencias en forma y tamaño dependen en parte del proceso de división celular que transforma el cigoto en un organismo multicelular. La división celular, a su vez, es sensible a sucesos moleculares del interior de la célula, y estos sucesos pueden estar sometidos a un grado de aleatoriedad importante. Por ejemplo, la vitamina llamada biotina es esencial para el crecimiento de *Drosophila*, pero su concentración media es de sólo una molécula por célula. Sin duda, la velocidad de cualquier proceso que dependa de la presencia de esta molécula estará sujeta a fluctuaciones, según las variaciones en la concentración de biotina. Pero las células se multiplican para producir células diferenciadas de ojo sólo en la etapa del desarrollo, relativamente corta, durante la que se produce la formación del ojo. Así pues, aún cuando genotipo y medio ambiente estén fijados de forma precisa, esperamos cierta variación aleatoria en características fenotípicas tales como número de células del ojo, número de cabellos, forma exacta de rasgos menores, o número de neuronas del complejísimo sistema nervioso central. Se producen variaciones aleatorias, por la misma razón, incluso en estructuras tales como el sencillo sistema nervioso de los nematodos. Los acontecimientos aleatorios durante el desarrollo producen una variación en el fenotipo que se denomina **ruido de desarrollo**.

COROLARIO

El ruido de desarrollo es causa importante de las variaciones fenotípicas observadas en algunos rasgos, tales como el número de células del ojo de *Drosophila*.

El ruido de desarrollo, como el ruido en una conversación, añade pequeñas variaciones aleatorias al predecible proceso de desarrollo gobernado por las normas de reacción. Si incluimos el ruido de desarrollo en nuestro modelo sobre la aparición del fenotipo, obtenemos algo como la Figura 1-25. Partiendo de un genotipo y un ambiente determinados, en cada etapa del desarrollo existe un espectro de posibilidades. El proceso de desarrollo incluye sistemas de retroalimentación que tienden a enderezar posibles desviaciones, dentro de ciertos límites, de manera que la amplitud de la desviación no aumenta indefinidamente durante las muchas etapas del desarrollo. Sin embargo, este sistema de retroalimentación no es perfecto. Durante el desarrollo de cualquier genotipo concreto en una determinada sucesión cronológica de ambientes, se mantiene cierto grado de incertidumbre sobre el fenotipo exacto que acabará resultando.

Tres niveles de desarrollo

Los Capítulos 22 y 23 de este libro se refieren a la Genética del desarrollo. Están dedicados íntegramente al modo en que los genes regulan el desarrollo, y en ninguno de sus apartados consideramos el papel del medio ambiente o la influencia del ruido de desarrollo. ¿Cómo podemos poner tanto énfasis al comienzo de este libro en el papel conjunto de genes, medio ambiente y ruido en la determinación del fenotipo e ignorar luego, en posteriores consideraciones sobre Genética del desarrollo, el papel del ambiente? La respuesta es que la moderna Genética del desarrollo se preocupa de procesos muy básicos de diferenciación que son comunes a todos los miembros individuales de una especie y, en realidad, resultan comunes a animales tan distintos como la mosca del vinagre y los mamíferos. ¿Cómo llega a diferenciarse la parte anterior de un organismo de su parte posterior, o su parte

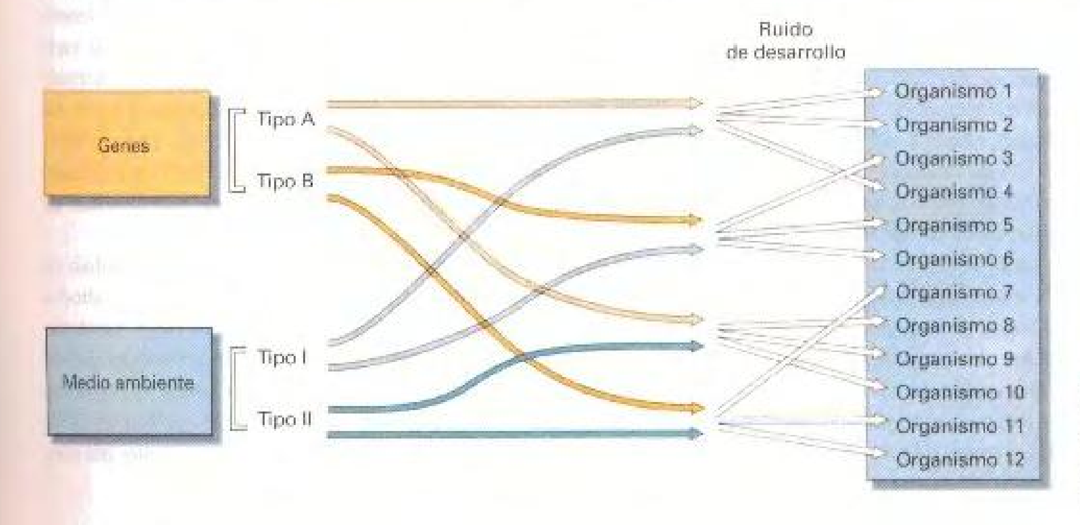


Figura 1-25. Modelo de determinación fenotípica que muestra cómo genes, medio ambiente y ruido de desarrollo actúan conjuntamente para producir un fenotipo concreto.

ventral de su parte dorsal? ¿Cómo se produce la segmentación del cuerpo, y por qué aparecen apéndices en algunos segmentos y en otros no? ¿Por qué los ojos se forman en la cabeza y no en el abdomen? ¿Por qué son ahora tan distintas las antenas, alas y patas de una mosca, cuando derivan evolutivamente de apéndices que eran iguales en los primeros ancestros de los insectos? A este nivel del desarrollo, constante entre individuos y especies, las variaciones normales del medio ambiente no juegan papel alguno, y podemos hablar correctamente de los genes como «determinantes» del fenotipo. Precisamente porque a este nivel del desarrollo los efectos de los genes pueden distinguirse perfectamente, y porque los procesos implicados parecen tener validez general para un amplio abanico de organismos, su estudio resulta más fácil que el de las características para las que el efecto de la variación ambiental resulta importante, y la Genética del desarrollo se ha concentrado en comprenderlos.

En un segundo nivel, se producen variaciones de los aspectos básicos del desarrollo que resultan diferentes entre especies distintas pero constantes dentro de una especie, y también éstas pueden comprenderse concentrándose en los genes, aunque de momento no constituyen objeto de estudio de la Genética del desarrollo. Así, aunque leones y corderos poseen cuatro patas, una en cada esquina, los leones siempre engendran leones y los corderos siempre corderos, sin que tengamos dificultad alguna en distinguir unos de otros en cualquier ambiente. También aquí tenemos derecho a decir que son los genes los que «determinan» la diferencia entre dos especies, aunque debamos ser más precavidos en este caso. Dos especies pueden diferir en algún rasgo porque viven en ambientes muy distintos, y hasta que no podamos criarlas en el mismo ambiente no podremos estar seguros de si el ambiente juega o no algún papel en esa diferencia. Por ejemplo, dos especies de babuinos africanos, habitante una de llanuras muy secas de Etiopía y la otra de zonas más fértiles de Uganda, muestran comportamientos de recolección de alimentos y estructuras sociales muy diferentes. Sin trasplantar realmente colonias de las dos especies de un medio a otro, no podremos establecer en qué grado tales diferencias se deben a una respuesta directa de estos primates a las diferentes condiciones de alimentación.

Es en un tercer nivel, el de las diferencias morfológicas, fisiológicas y de conducta entre individuos de una misma especie, en el que se produce la actuación conjunta de los factores genéticos, ambientales y relacionados con el ruido de desarrollo, como hemos visto en este capítulo. Uno de los errores más serios en la comprensión de la Genética por parte de los no especialistas ha sido la confusión entre variación a este nivel y variación a los niveles más generales. Los experimentos y descubrimientos que se discutirán en los Capítulos 22 y 23 no inciden, ni pretenden hacerlo, en la explicación causal de la variación individual. Se aplican directamente sólo a aquellas características, deliberadamente escogidas, que constituyen rasgos generales del desarrollo y para las que el medio ambiente resulta irrelevante. Todavía no hay experimentos, ni idea alguna de cómo llevarlos a cabo, que permitan conectar entre sí las explicaciones que se aplican a los diferentes niveles del desarrollo.

RESUMEN

La Genética es el estudio de los genes a cualquier nivel, de las moléculas a las poblaciones. Como disciplina moderna, comenzó en la década de 1860 con el trabajo de Gregor Mendel, primero en proponer la idea de que existen los genes. Hoy sabemos que un gen es un tramo funcional de la larga molécula de DNA que constituye la estructura fundamental de un cromosoma. El DNA está compuesto de cuatro nucleótidos, cada uno de los cuales contiene el azúcar desoxirribosa, fosfato y una de cuatro bases, adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C). El DNA está formado por dos cadenas de nucleótidos antiparalelas que se mantienen unidas mediante enlaces de A con T y de G con C. Las dos cadenas se separan durante la replicación y sus bases expuestas sirven de molde para la síntesis de dos moléculas hijas de DNA idénticas.

La mayoría de los genes determinan la estructura de una proteína (las proteínas son las principales responsables de las propiedades de un organismo). Para generar la proteína, el DNA es primero transcrito por la enzima polimerasa de RNA en una copia de trabajo de una sola cadena llamada RNA mensajero (mRNA). El RNA se sintetiza en dirección 5′ → 3′, empleando como molde una sola de las cadenas del DNA. Para la síntesis de la proteína, la secuencia de nucleótidos del mRNA es traducida a una secuencia de aminoácidos, que constituye la estructura primaria de una proteína. Las cadenas de aminoácidos se fabrican en los ribosomas. Cada aminoácido es acarreado al ribosoma por una molécula de tRNA que se acopla uniendo su anticodón triplete a un codón triplete del mRNA.

La variación es de dos tipos: discontinua, con dos o más fenotipos bien distinguibles unos de otros, y continua, con fenotipos que aparecen en un amplio abanico de valores cuantitativos. Las variantes discontinuas se deben normalmente a formas alternativas (alelos) de un gen. Por ejemplo, las personas con una piel de pigmentación normal poseen el alelo funcional que determina la enzima tirosinasa, que convierte la tirosina en el pigmento oscuro melanina, mientras que los albinos poseen una versión mutada de tal gen que determina una proteína que no puede llevar a cabo tal conversión.

La relación entre genotipo y fenotipo en un rango de variaciones ambientales se denomina norma de reacción. Los genetistas estudian en el laboratorio las variantes discontinuas en condiciones en las que hay una relación unívoca entre genotipo y fenotipo. Sin embargo, en las poblaciones naturales, en las que varía tanto el medio ambiente como el genotipo, se produce normalmente una situación más compleja, y los genotipos pueden dar lugar a distribuciones superpuestas de fenotipos. Como consecuencia, son las variantes discontinuas las que se han empleado como material de partida en la mayoría de los experimentos de análisis genéticos.

Los principales instrumentos de la Genética son el análisis de cruzamientos controlados de variantes hereditarias, métodos bioquímicos y de microscopia, y la clonación de DNA. La clonación de DNA se lleva a cabo mediante la inserción del gen de interés en un pequeño cromosoma accesorio, como un plásmido, y dejando que la bacteria haga el trabajo de replicar el DNA insertado. Un DNA clonado constituye una sonda muy útil para detectar moléculas de DNA y RNA relacionadas.

MAPA DE CONCEPTOS

Cada capítulo contiene un ejercicio para trazar mapas de conceptos. Trazar estos mapas le permitirá organizar los conocimientos que acaba de adquirir. Conforme vamos aprendiendo, debemos colocar los nuevos conocimientos en la estructura conceptual global de la disciplina. Parte esencial de esta tarea es establecer relaciones entre el nuevo conocimiento y el adquirido previamente. No es tan fácil como parece, y a veces la mente nos hace creer engañosamente que ya hemos adquirido una idea completa del tema. Los mapas de conceptos resultan muy convenientes para demostrarnos a nosotros mismos que realmente sabemos cómo se relacionan entre sí las varias estructuras, procesos e ideas de la Genética. Los mapas ayudan también a detectar lagunas en nuestro conocimiento.

Se ofrecen unos términos seleccionados, y el reto consiste en trazar líneas o flechas entre aquellos que considere relacionados, colocando sobre la flecha una descripción que aclare en qué consiste precisamente esa relación. Trace tantas relaciones como le sea posible. Esfuércese en establecer conexiones, no importa cuán remotas puedan parecerle al principio. La descripción sobre la flecha deber ser suficientemente clara para que otra persona que lea el mapa entienda lo que usted está pensando. Los mapas revelan a veces una serie sencilla de pasos consecutivos, a veces una compleja red de interacciones. No existe una respuesta correcta única; hay muchas variaciones correctas. Aunque, desde luego, podría establecer conexiones incorrectas y detectar esas incorrecciones es también parte del objetivo de este ejercicio.

La Figura 1-26 muestra un ejemplo de mapa de conceptos que relaciona entre sí los términos siguientes, tomados de diferentes capítulos:

cambio de un par de bases / recesivo / proporción 3:1 / albino / ambiente / melanina / ruta metabólica / centro activo / enzima/gen

Ahora, trace un mapa de conceptos de este capítulo, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

genotipo / fenotipo / norma de reacción / medio ambiente / desarrollo / organismo

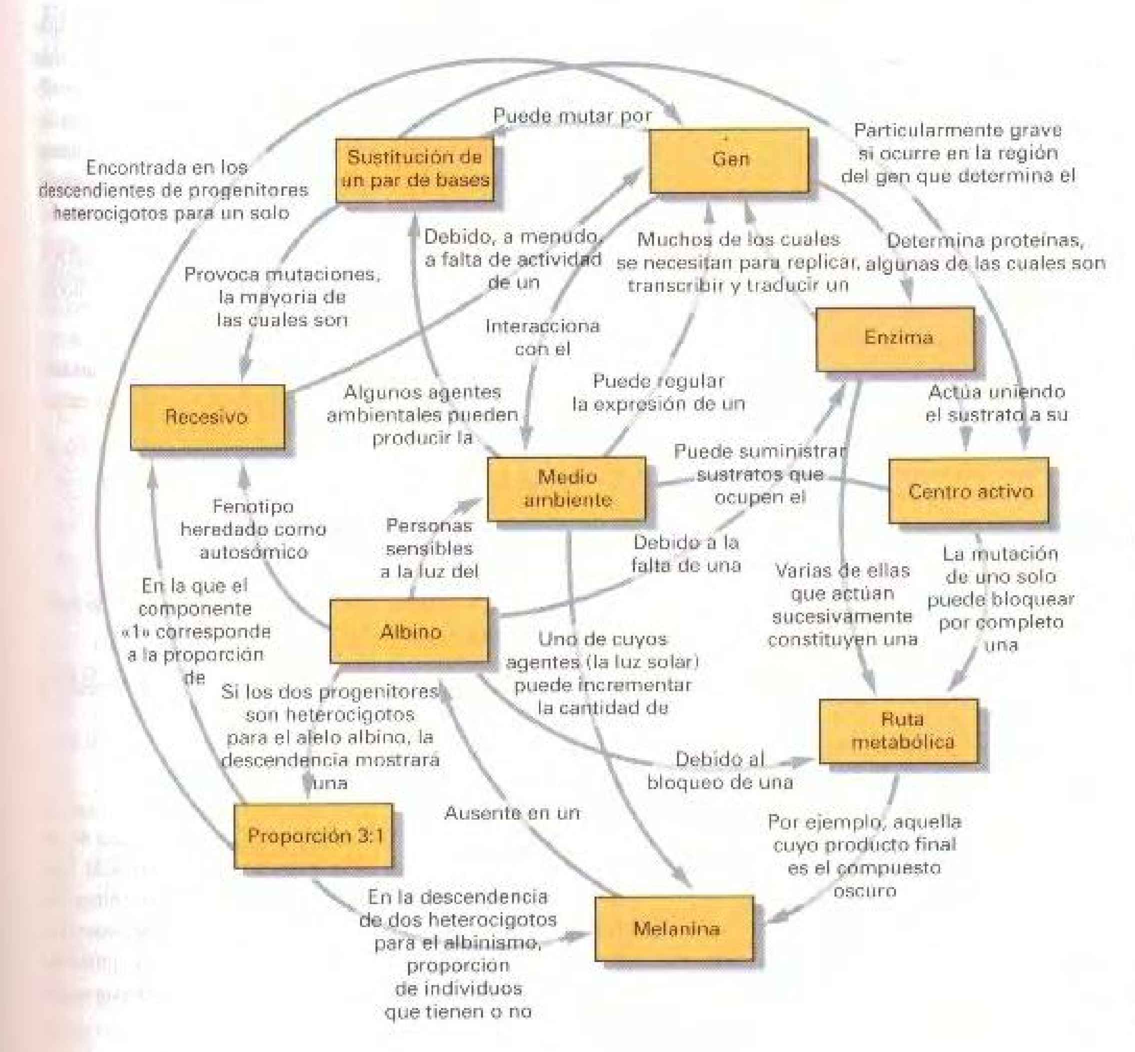


Figura 1-26. Ejemplo de mapa de conceptos.

PROBLEMAS

1. Defina la Genética. ¿Consideraría genetistas a los antiguos egipcios que criaban caballos de carrera? ¿En qué forma es posible que se diferenciaran sus procedimientos de los que usan los genetistas modernos?

2. ¿Cómo dicta el DNA las propiedades generales de una especie?

3. ¿Qué dos aspectos del DNA le hacen idóneo como molécula hereditaria? ¿Puede imaginar tipos alternativos de moléculas hereditarias que podrían encontrarse en formas de vida extraterrestres?

4. ¿Cuántas moléculas distintas de DNA de 10 pares de nucleótidos de largo son posibles?

5. Si la tiamina constituye el 15% de las bases de una muestra de DNA, ¿qué porcentaje de las bases corresponden a la citosina?

6. Si el contenido de G + C de una muestra de DNA es 48%, ¿cuáles son las proporciones de cada uno de los cuatro nucleótidos?

7. Dibuje un esquema de una molécula de DNA en el que quede claro

   a. cuáles son los extremos 5′ y 3′.

   b. qué es un esqueleto azúcar-fosfato.

8. Cada célula del cuerpo humano contiene 46 cromosomas.

   a. ¿A cuántas moléculas de DNA equivalen?

   b. ¿Cuántos tipos distintos de moléculas de DNA representan?

9. Una de las cadenas de cierto tramo de DNA tiene la siguiente secuencia de nucleótidos:

   5′-ATTGGTGCATTACTTCAGGCTCT-3′

   ¿Cuál debe ser la secuencia de la otra cadena? (señale sus extremos 5′ y 3′)

10. ¿Es posible que el número de adeninas sea mayor que el de timinas en una cadena sencilla de DNA?

11. En una hélice doble normal de DNA, ¿es verdad que

    a. A más C es siempre igual a G más T?

    b. A más G es siempre igual a C más T?

12. Suponga que la molécula indicada de DNA es replicada para producir dos moléculas hijas. Dibuje estas dos moléculas, usando el color negro para los nucleótidos previamente polimerizados y el color rojo para los nucleótidos polimerizados de nuevo.

    3′-TTGGCACGTCGTAAT-5′
    5′-AACCGTGCAGCATTA-3′

13. Considere la molécula de DNA del problema 12. Suponiendo que la cadena de abajo es la que actúa de molde, indique el transcrito de RNA, señalando sus extremos 5′ y 3′.

14. Dibuje los resultados esperados de emplear las técnicas de Northern y de Western para analizar los tres genotipos de la Figura 1-15 (considere que la sonda empleada en el «Northern» es un clon del gen de la tirosinasa).

15. Los elementos químicos más comunes de los seres vivos son carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. ¿De cuáles de ellos carece el DNA?

16. ¿Qué es un gen? ¿Qué problemas tiene la definición que ha dado?

17. El gen de la proteína humana albúmina ocupa una región cromosómica de 25 000 pares de nucleótidos (25 kilobases, o kb), contando desde el comienzo hasta el final de la secuencia determinadora de proteína, pero la longitud del RNA mensajero para esa proteína es de sólo 2.1 kb. ¿Cuál cree que es la causa de esa diferencia tan grande?

18. Extraemos DNA de células de *Neurospora*, un hongo que tiene una dotación de siete cromosomas, del guisante, una planta que tiene dos dotaciones de siete cromosomas, y de la mosca doméstica, un animal que tiene dos dotaciones de seis cromosomas. Si empleamos una electroforesis potente para fraccionar el DNA en un gel, ¿cuántas bandas producirán cada una de esas especies?

19. Invente una fórmula que relacione el tamaño del mRNA con el tamaño del gen y con el número y tamaño medio de los intrones.

20. Si un codón de un mRNA es 5′-UUA-3′, ¿cuál es el anticodón del tRNA que se unirá a ese codón? (señale sus extremos 5′ y 3′).

21. Considere la siguiente secuencia de DNA:

    5′ GCTTCCCAA 3′
    3′ CGAAGGGTT 5′

    Suponga que la cadena superior es la empleada como molde por la polimerasa de RNA

    a. ¿Se transcribirá de izquierda a derecha o de derecha a izquierda?

    b. Indique la secuencia del RNA.

    c. Señale sus extremos 5′ y 3′.

22. Aparecen dos mutaciones en dos cultivos separados de un hongo (que posee una sola dotación cromosómica) que normalmente es de color rojo. Las mutaciones resultan haber ocurrido en genes distintos. La mutación 1 provoca color naranja, y la mutación 2 color amarillo. Bioquímicos que trabajan en la síntesis del pigmento rojo de esta especie han descrito ya la ruta siguiente:

precursor incoloro $\xrightarrow[\text{enzima A}]{}$ pigmento amarillo $\xrightarrow[\text{enzima B}]{}$

pigmento naranja $\xrightarrow[\text{enzima C}]{}$ pigmento rojo

a. ¿Qué enzima es defectuosa en el mutante 1?

b. ¿Qué enzima es defectuosa en el mutante 2?

c. ¿Cuál sería el color de un doble mutante (mutaciones 1 y 2)?

23. El color púrpura de los pétalos del guisante dulce está controlado por dos genes, *B* y *D*. La ruta es la siguiente:

precursor incoloro $\xrightarrow{\text{gen } B}$ pigmento antocianina roja } púrpura
precursor incoloro $\xrightarrow[\text{gen } D]{}$ pigmento antocianina azul }

a. ¿Qué color de pétalos cabe esperar de una planta que lleva dos copias de una mutación nula de *B*?

b. ¿Qué color de pétalos cabe esperar de una planta que lleva dos copias de una mutación nula de *D*?

c. ¿Qué color de pétalos cabe esperar de una planta doble mutante, es decir que lleva dos copias de una mutación nula tanto de *B* como de *D*?

El problema paso a paso

En muchos capítulos, uno de los problemas incluirá preguntas para abordarlo «paso a paso». Estas preguntas están planteadas para ayudar a resolver el problema, mostrando el extenso contenido que frecuentemente va asociado al problema. El mismo abordaje puede ser aplicado por el lector a otros problemas. Si tiene dificultades con el problema 23, trate de responder a las siguientes preguntas que permiten abordarlo paso a paso. Si fuera necesario, consulte los temas que no recuerde. Al final, trate de resolver de nuevo el problema con la información surgida de sus contestaciones a las sucesivas preguntas.

1. ¿Qué es el guisante dulce y en qué se diferencia del guisante comestible?
2. ¿Qué es una ruta, en el sentido empleado aquí?
3. ¿Cuántas rutas aparecen en este sistema?
4. ¿Son independientes?
5. Defina el término *pigmento*.
6. ¿Qué significa «incoloro» en este problema? Piense en algún compuesto incoloro.
7. ¿Qué aspecto tendría un pétalo que sólo contiene sustancias incoloras?
8. ¿Tiene que ver el color del guisante dulce con algo así como una mezcla de pinturas?
9. ¿Qué es una mutación?
10. ¿Qué es una mutación nula?
11. ¿Cuál puede ser la causa de una mutación nula al nivel del DNA?
12. ¿Qué significa «dos copias»? (¿cuántas copias de los genes tiene normalmente el guisante dulce?)
13. ¿Cuál es la importancia de las proteínas en este problema?
14. ¿Importa que los genes *B* y *D* estén o no en el mismo cromosoma?
15. Dibuje una representación del alelo silvestre de *B* y otra del mutante nulo, al nivel del DNA.
16. Idem para el gen *D*.
17. Idem para el doble mutante.
18. ¿Cómo le explicaría la determinación genética del color de los pétalos del guisante dulce a un jardinero sin conocimientos científicos?

24. Se examinan doce alelos nulos de un gen sin intrones de *Neurospora*, y todos los sitios mutantes resultan estar agrupados en una región que ocupa el tercio central del gen. ¿Cuál puede ser la explicación?

25. Se ha obtenido un mutante de ratón albino, carente del pigmento melanina sintetizado por la enzima T. Ciertamente, el tejido del mutante carece de actividad detectable de la enzima T. Sin embargo, la técnica de Western muestra claramente la presencia en el mutante de una proteína con propiedades inmunológicas idénticas a las de la enzima T normal. ¿Cómo es ello posible?

26. En Noruega, en 1934, una madre con dos hijos retrasados mentales consultó con el médico Asbjorn Folling. En la consulta, Folling se enteró de que la orina de los niños tenía un curioso olor. Más tarde trataría su orina con cloruro férrico y comprobó que se volvía de color verde, mientras que la orina normal se vuelve de color marrón. Dedujo que el agente químico responsable debía ser el ácido fenilpirúvico. Por su similitud química con la fenilalanina, parecía probable que tal agente químico se formara a partir de la fenilalanina de la sangre, pero no había entonces un ensayo de detección de fenilalanina. Sin embargo, cierta bacteria podía convertir fenilalanina en ácido fenilpirúvico, de modo que podía medir la concentración de fenilalanina mediante la prueba del cloruro férrico. Ciertamente, se descubrió que los niños tenían niveles muy altos de fenilalanina en su sangre, que probablemente era la fuente del ácido fenilpirúvico. Esta enfermedad, que se conocería luego como fenilcetonuria (PKU), demostró ser heredable y debida a un alelo recesivo.

Llegó a aclararse que la fenilalanina era la culpable, que se acumulaba en los enfermos de PKU y que se convertía en niveles altos de ácido fenilpirúvico, el cual interfería con el desarrollo normal del tejido nervioso. Este descubrimiento llevó a la formulación de una dieta baja en fenilalanina para los recién nacidos diagnosticados como enfermos de PKU, dieta que permitía la continuación normal de su desarrollo, sin retraso mental. En realidad, se descubrió que tras completarse el desarrollo del sistema nervioso del niño, podía retirársele la dieta especial. Sin embargo, trágicamente, se comprobó que muchas mujeres susceptibles de padecer PKU que se habían desarrollado normalmente con la dieta especial dieron a luz hijos que nacieron ya con re-

traso mental, sin que la dieta especial tuviera ahora efecto sobre ellos.

a. ¿Cuál crees que es la causa de que los niños de las madres con PKU nacieran retrasados?

b. ¿Por qué la dieta especial no tiene efecto sobre ellos?

c. Explique la causa de la diferencia de resultados entre los niños enfermos de PKU y los niños de madres enfermas de PKU.

d. Proponga un tratamiento que permitiera tener hijos normales a las madres enfermas de PKU.

e. Escriba un ensayo breve sobre la PKU, integrando conceptos genéticos, diagnósticos, enzimáticos, fisiológicos y relacionados con las familias y la población en general.

27. La hormona tiroidea llamada tiroxina se fabrica normalmente mediante una enzima, como sigue:

$$\text{tirosina} \xrightarrow{\text{enzima}} \text{tiroxina}$$

Si la enzima es defectuosa, se producen unos síntomas conocidos como cretinismo genético con bocio (GGC), un síndrome raro caracterizado por escaso crecimiento, tiroides aumentado de tamaño (bocio) y retraso mental.

a. Si el alelo normal es haplosuficiente, ¿esperaría que el GGC se heredara como un fenotipo dominante o recesivo?

b. Especule sobre la naturaleza del alelo responsable del GGC, comparando su secuencia molecular con la del alelo normal. Muestre cómo da lugar a una enzima inactiva.

c. ¿Cómo podrían aliviarse los síntomas del GGC?

d. Al nacer, los niños afectados de GGC son perfectamente normales y desarrollan los síntomas con la edad. ¿Por qué cree que es así?

28. Compare y contraste los procesos por los que la información se hace forma en un organismo y en la construcción de un edificio.

29. Trate de encontrar excepciones a la aseveración hecha en este capítulo de que «cuando observas a un ser vivo, cuanto ves es proteína o algo producido por una proteína».

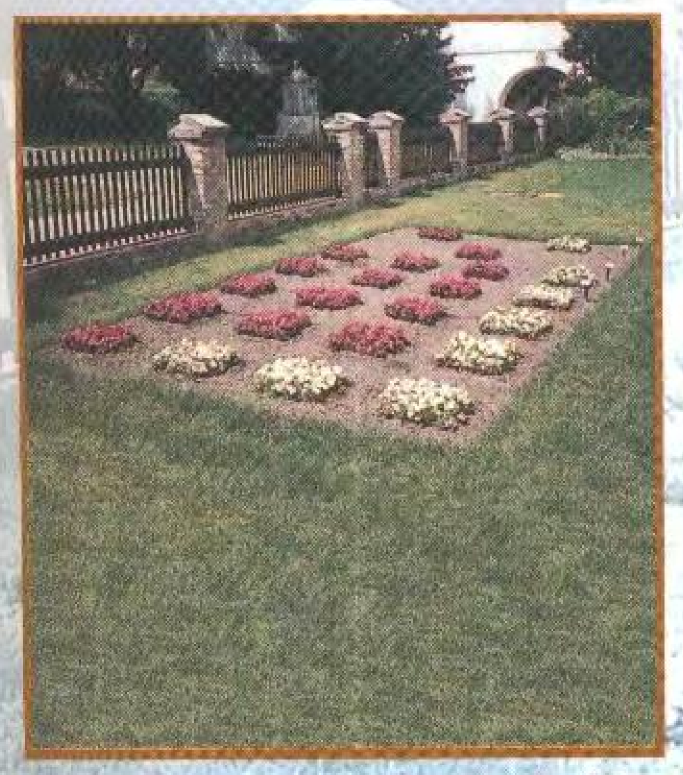
30. ¿Qué importancia tienen las normas de reacción en relación con la variación fenotípica dentro de una misma especie?

31. ¿Cuáles son los tipos de variación fenotípica dentro de una misma especie y cuál es su importancia relativa?

32. ¿Es válida la fórmula «genotipo + medio ambiente = fenotipo»?

2

PATRONES DE HERENCIA



Pequeño jardín del monasterio en el que Mendel realizó sus experimentos con guisantes.
Una estatua de Mendel es visible al fondo. Actualmente, esta parte del monasterio es un museo, cuyos conservadores han plantado begonias rojas y blancas con una disposición que representa gráficamente algunos de los resultados de Mendel.
(Anthony Griffiths.)

Ideas fundamentales

- La existencia de genes puede inferirse observando ciertas proporciones fijas en la descendencia de cruzamientos entre variantes fenotípicas.
- La diferencia fenotípica discreta en un carácter está determinada a menudo por una diferencia en un solo gen.
- En plantas y animales, cada gen está presente en dos copias por célula, una en cada miembro de un par cromosómico.
- Los patrones hereditarios se basan en la conducta de los cromosomas durante la meiosis.
- Durante la formación de los gametos, cada miembro de un par génico segrega (se distribuye) a la mitad de los gametos.
- Durante la formación de los gametos, dos genes situados en pares cromosómicos distintos se comportan de manera independiente.
- Los genes de los cromosomas sexuales muestran patrones de herencia especiales.

El gen, la unidad funcional básica de la herencia, es el foco de atención de la Genética moderna. En todas las líneas de investigación genética, el gen constituye el hilo unificador común de una gran variedad de estudios experimentales. En este capítulo, analizaremos los patrones según los cuales se heredan los fenotipos en plantas y animales, y veremos que estos patrones son regulares y predecibles. Precisamente, fueron estos patrones hereditarios regulares los que primero llevaron al concepto de gen, y por aquí es por donde comenzaremos nuestra historia.

El concepto de gen (aunque no la palabra) fue propuesto por primera vez en 1865 por Gregor Mendel. Hasta entonces, se habían realizado pocos avances en el entendimiento de los mecanismos de la herencia. La noción que prevalecía era que el espermatozoide y el óvulo contenían un conjunto de esencias originadas en las distintas partes del cuerpo del organismo parental; durante la concepción, estas esencias se mezclaban de alguna forma para influir en el desarrollo del nuevo descendiente. Esta idea de **herencia mezclada** surgió para explicar el hecho de que la descendencia muestra normalmente características que son similares a las de ambos progenitores. Sin embargo, había problemas obvios asociados con esta idea, uno de los cuales es que la descendencia no es siempre una mezcla intermedia de las características de los padres. Los intentos para mejorar y extender esta teoría, originalmente concebida por Aristóteles, no llevaron a un mejor entendimiento de la herencia.

Como resultado de su investigación con plantas de guisante, Mendel propuso una teoría de **herencia particulada**. De acuerdo con esta teoría, los caracteres están determinados por unidades discretas que se heredan intactas a lo largo de las generaciones. Este modelo explicaba muchas observaciones que no eran explicadas por la hipótesis de la herencia mezclada. También sirvió como marco para un posterior y más detallado entendimiento de los mecanismos de la herencia.

La importancia de las ideas de Mendel no se reconoció hasta cerca de 1900 (después de su muerte). Su trabajo escrito fue entonces descubierto de nuevo por tres científicos, después de que cada uno de ellos hubiera obtenido de forma independiente el mismo tipo de resultados. El trabajo de Mendel constituye el prototipo del análisis genético. Estableció una forma de enfoque lógico y experimental al estudio de la herencia que todavía se emplea hoy en día. Por ello, aunque la siguiente descripción es histórica, la secuencia experimental es la misma que utilizan actualmente los genetistas.

Los experimentos de Mendel

Gregor Mendel nació en la región de Moravia, que en aquella época formaba parte del Imperio Austrohúngaro. Al final de sus estudios superiores, se incorporó al monasterio agustino de Santo Tomás en la ciudad de Brünn, la actual Brno de la República Checa. Su monasterio estaba dedicado a la enseñanza de la ciencia y a la investigación científica, de modo que Mendel fue enviado a la universidad de Viena con el fin de obtener su título docente. Sin embargo, suspendió los exámenes y volvió al monasterio de Brünn. Allí se embarcó en un programa de investigación sobre la hibridación de plantas que le llevó póstumamente a ser reconocido como el fundador de la ciencia de la Genética.

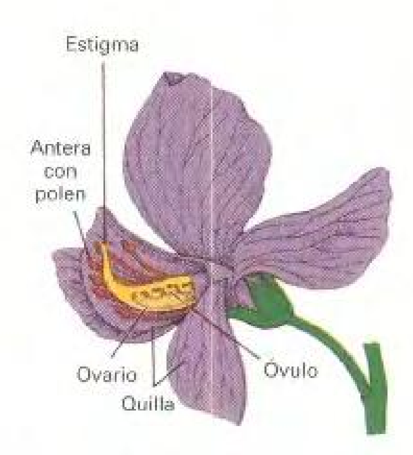


Figura 2-1. Esquema de una flor de guisante con la quilla cortada y abierta para exponer los órganos reproductores. También se muestra un corte del ovario. (Según J. B. Hill, H. W. Popp y A. R. Grove, Jr., *Botany*. Copyright © 1967, McGraw-Hill.)

Los estudios de Mendel constituyen un ejemplo sobresaliente de la correcta utilización del método científico. Eligió un material de investigación muy adecuado para el estudio que quería realizar, diseñó sus experimentos muy cuidadosamente, recogió gran cantidad de datos y utilizó el análisis matemático para demostrar que los resultados obtenidos eran coherentes con su hipótesis. Las predicciones de la hipótesis se comprobaron otra vez en una nueva serie de experimentos.

Mendel estudió el guisante de jardín (*Pisum sativum*) por dos razones principales. En primer lugar, disponía en el mercado de una amplia variedad de guisantes de distintas formas y colores, que podían identificarse y analizarse fácilmente. En segundo lugar, los guisantes pueden **autopolinizarse** o cruzarse mediante polinización cruzada. El guisante se autopoliniza porque las partes masculinas (anteras) y las femeninas (ovarios) de la flor (que producen, respectivamente, el polen y los óvulos) están encerradas por dos pétalos fusionados que forman un compartimiento denominado quilla (Fig. 2-1). El jardinero, o el investigador, puede **cruzar** dos plantas de guisante a voluntad (polinización cruzada). Para ello, se eliminan las anteras de una planta antes de que éstas se hayan abierto para soltar el polen, operación que se denomina emasculación y que se hace para prevenir la autopolinización. El polen de la otra planta se transfiere al estigma receptor con la ayuda de un pincel o con la propia antera (Fig. 2-2). De esta forma, el investigador puede elegir entre la autopolinización o la polinización cruzada de las plantas de guisante.

Otras razones prácticas para la elección de Mendel fueron que los guisantes eran baratos y fáciles de obtener, que ocupaban poco espacio, que tenían un tiempo de generación corto y que producían muchos descendientes.

Plantas que difieren en un solo carácter

Mendel eligió siete *caracteres* para su estudio. En este contexto, la palabra **carácter** significa una propiedad específica de un or-



Figura 2-2. Una de las técnicas de polinización cruzada artificial, realizada con *Mimulus guttatus*, la llamada flor del mono amarillo. Para transferir el polen, el experimentador aplica anteras del parental masculino sobre el estigma de una flor emasculada, que actúa como parental femenino. (Anthony Griffiths.)

ganismo; los genetistas usan este término como sinónimo de característica o rasgo.

Para cada uno de los caracteres escogidos, Mendel obtuvo líneas de plantas que había cultivado durante dos años, para asegurar que fueran líneas puras. Una **línea pura** es una población que produce descendencia homogénea para el carácter específico en estudio; todos los descendientes obtenidos por autopolinización o fecundación cruzada entre los individuos de la población son idénticos para dicho carácter. Asegurándose de la pureza de las líneas, Mendel dio un primer paso inteligente: había establecido una situación fija de partida para sus experimentos futuros, de forma que cualquier variación observada en su investigación tras una manipulación deliberada sería científicamente significativa; había establecido, de hecho, un experimento control.

Dos de las líneas de guisantes estudiadas por Mendel demostraron ser homogéneas para el carácter color de la flor. Una línea presentaba flores púrpuras y la otra flores blancas. Cualquier planta de la línea de flores púrpuras (ya fuera autopolinizada o cruzada con otra de la misma línea) producía semillas que, en todos los casos, daban lugar a plantas con flores púrpuras. Si, a su vez, estas plantas eran autopolinizadas o cruzadas con la misma línea, sus descendientes también presentaban flores púrpuras, y así sucesivamente. De la misma forma, la línea de flores blancas sólo producía flores blancas de generación en generación. Mendel obtuvo siete parejas de líneas puras para siete caracteres, diferenciándose cada pareja sólo respecto de un carácter (Fig. 2-3).

Puede decirse que cada pareja de las líneas de plantas de Mendel muestra **diferencia en un carácter**: una distinción clara entre dos líneas de organismos (o entre dos organismos) con respecto a un carácter determinado. Contrastar fenotipos para un determinado carácter constituye el punto de partida del análisis genético. Las diferentes líneas (o individuos) representan las di-

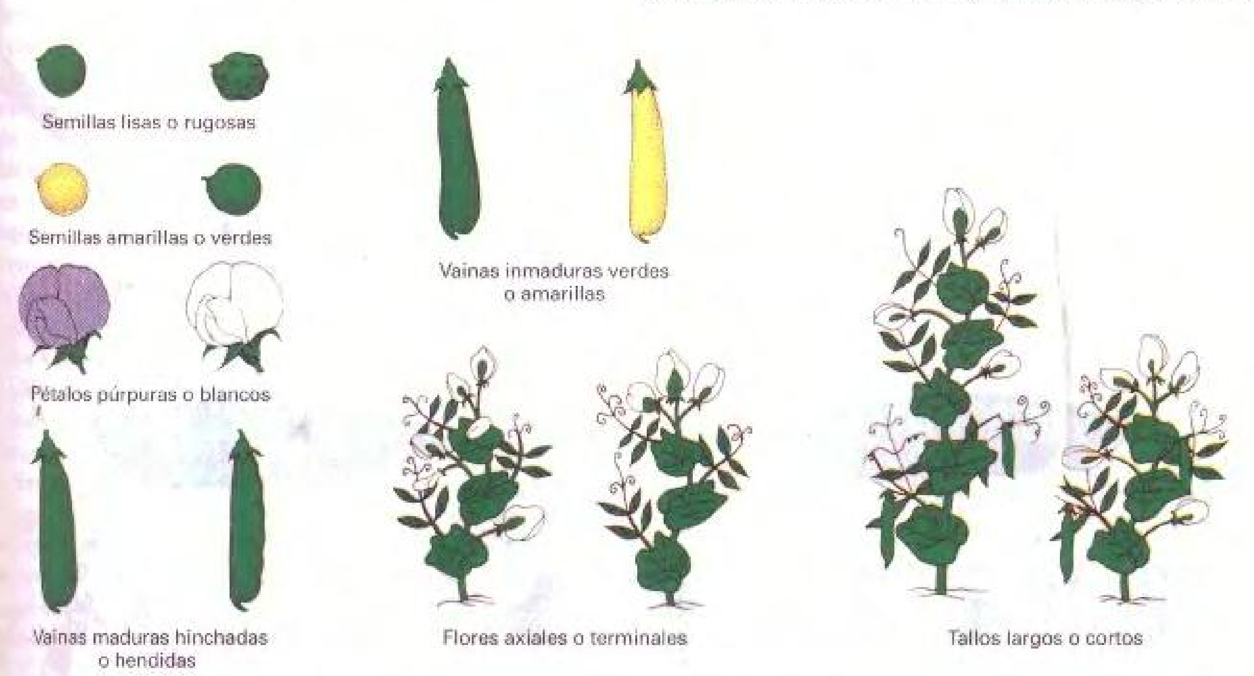


Figura 2-3. Las siete diferencias en los caracteres estudiados por Mendel. (Según S. Singer y H. Hilgard. *The Biology of People*. Copyright © 1978, W. H. Freeman and Company).

ferentes formas que el carácter puede tomar: pueden denominarse *formas del carácter*, *variantes del carácter* o **fenotipos**. El término *fenotipo* (que proviene del griego) significa literalmente «la forma que se muestra», y es el término utilizado actualmente por los genetistas. Aunque palabras como gen y fenotipo no fueran acuñadas ni utilizadas por Mendel, las usaremos aquí al describir sus resultados e hipótesis.

La Figura 2-3 muestra los siete caracteres del guisante estudiados por Mendel, cada uno representado por dos fenotipos diferentes. La descripción de los caracteres es algo arbitraria. Por ejemplo, podemos tratar las diferencias en el carácter *color* al menos de tres formas:

Carácter	Fenotipos
Color de la flor	Púrpura o blanco
Flores púrpuras	Presentes o ausentes
Flores blancas	Presentes o ausentes

Afortunadamente, la forma en que describamos los caracteres no altera los resultados finales del análisis, excepto en cuanto a las palabras empleadas.

Volvamos ahora al trabajo de Mendel sobre las líneas puras para el color de las flores. En uno de sus primeros experimentos, Mendel polinizó una planta de flores púrpuras con polen obtenido a partir de una planta de flores blancas. Estas plantas de líneas puras constituyen la **generación parental** (P). Todas las plantas resultantes de este cruzamiento presentaron flores de color púrpura (Fig. 2-4). Esta generación de descendientes se denomina **primera generación filial** (F_1). Las generaciones subsiguientes obtenidas por autopolinización se denominan F_2, F_3 y así sucesivamente.

Mendel realizó también **cruzamientos recíprocos**. Para la mayoría de las plantas, cualquier cruzamiento puede realizarse de dos formas, según qué fenotipo se utilice como masculino (♂) o femenino (♀). Por ejemplo, los cruzamientos

fenotipo A ♀ × fenotipo B ♂
fenotipo B ♀ × fenotipo A ♂

son cruzamientos recíprocos. El cruzamiento recíproco de Mendel, en el que polinizó una flor blanca con polen de una planta de flores púrpuras, produjo el mismo resultado (todas las plantas con flores púrpuras) en la F_1 (Fig. 2-5). Mendel concluyó que no importaba el modo en que se realizara el cruzamiento. Si uno de los parentales puros tiene flores púrpuras y el otro tiene flores blancas, todas las plantas de la F_1 presentan flores púrpuras. El color púrpura de las flores de la generación F_1 es idéntico al de las plantas parentales de flores púrpuras. En este caso, la herencia *no* es una simple mezcla de los colores púrpura y blanco para dar lugar a algún color intermedio. Para mantener la teoría de la herencia por mezcla, habría que asumir que el color púrpura es, de alguna manera, «más fuerte» que el color blanco y elimina completamente cualquier traza del fenotipo blanco en la mezcla.

A continuación, Mendel dejó que las plantas de la F_1 se autopolinizaran, permitiendo que el polen de cada flor se depositara sobre su propio estigma. Obtuvo 929 semillas (individuos de la F_2) y las sembró para obtener plantas de ellas. Curiosamente, algunas de las plantas resultantes tenían flores blancas; el fenotipo blanco había reaparecido. Entonces Mendel hizo algo que marca, mejor que ninguna otra cosa, el nacimiento de la Genética moderna: *contó* el número de plantas de cada fenotipo. Este procedimiento había sido usado rara vez, o nunca, en los estu-

Figura 2-4. Cruzamiento de Mendel de flores púrpuras ♀ × flores blancas ♂.

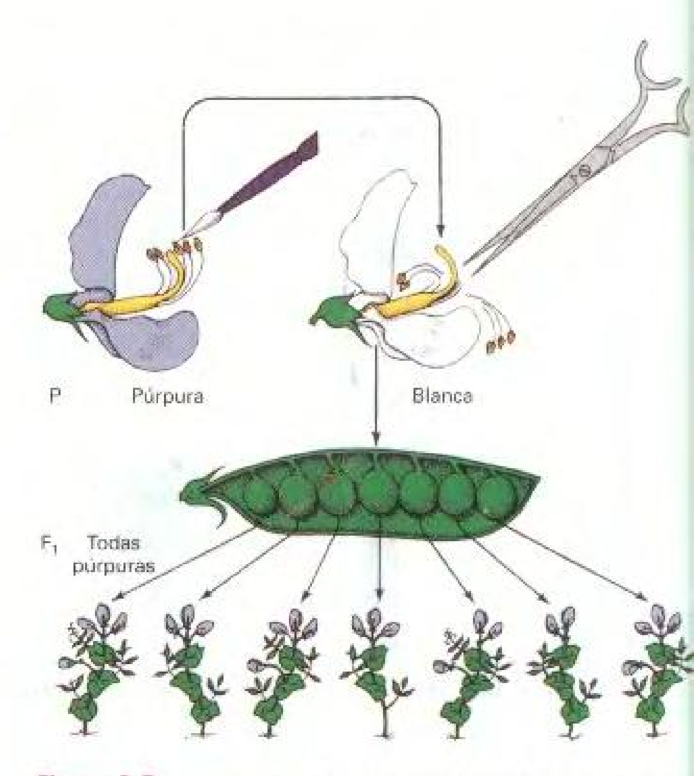


Figura 2-5. Cruzamiento de Mendel de flores blancas ♀ × flores púrpuras ♂.

CUADRO 2-1. Resultados de todos los cruzamientos de Mendel en los que los parentales diferían en un solo carácter

Fenotipo parental	F_1	F_2	Proporción F_2
1. Semilla lisa × rugosa	Todas lisas	5474 lisas; 1850 rugosas	2.96:1
2. Semilla amarilla × verde	Todas amarillas	6022 amarillas; 2001 verdes	3.01:1
3. Pétalos púrpuras × blancos	Todos púrpuras	705 púrpuras; 224 blancos	3.15:1
4. Vaina hinchada × hendida	Todas hinchadas	882 hinchadas; 299 hendidas	2.95:1
5. Vaina verde × amarilla	Todas verdes	428 verdes; 152 amarillas	2.82:1
6. Flores axiales × terminales	Todas axiales	651 axiales; 207 terminales	3.14:1
7. Tallo largo × corto	Todos largos	787 largos; 277 cortos	2.84:1

dios sobre herencia anteriores al trabajo de Mendel. De hecho, otros habían obtenido resultados extraordinariamente similares en estudios sobre cruzamientos, pero no contaron los individuos de cada clase. Mendel anotó 705 plantas de flores púrpuras y 224 de flores blancas, y se dio cuenta de que la proporción 705:224 es casi igual a la proporción 3:1 (de hecho, es 3.1:1).

Mendel repitió los mismos cruzamientos con las otras seis parejas de plantas de guisante que se diferenciaban en un solo carácter. Encontró la misma proporción 3:1 en la generación F_2 para cada una de las parejas (Cuadro 2-1). Para entonces, Mendel había empezado a tener pocas dudas sobre la importancia de la proporción 3:1 y trató de buscar una explicación para ella. En todos los casos, uno de los fenotipos parentales desaparecía en la F_1 para volver a manifestarse en la cuarta parte de los individuos de la F_2. Por ejemplo, el fenotipo blanco faltaba por completo en la generación F_1 pero volvía a aparecer (en su forma original) en la cuarta parte de las plantas de la F_2.

Resulta muy difícil explicar estos resultados en términos de herencia mezclada. Aun cuando las flores de la generación F_1 presentaban color púrpura, era evidente que las plantas mantenían el *potencial* para producir descendientes de flores blancas. Mendel infirió que las plantas de la F_1 reciben de sus progenitores la capacidad para producir tanto el fenotipo púrpura como el blanco y que, más que mezclarse, estas capacidades se mantienen y transmiten a las generaciones siguientes. ¿Por qué, entonces, no se expresa el fenotipo blanco en las plantas de la F_1? Mendel utilizó los términos **dominante** y **recesivo** para describir este fenómeno, aunque sin explicar su mecanismo. El fenotipo púrpura es dominante sobre el blanco, y el fenotipo blanco es recesivo frente al púrpura. Así, la definición operativa de dominancia se establece por el fenotipo de la F_1 tras el cruzamiento entre dos líneas puras. El fenotipo parental que aparece en tales individuos de la F_1 es, por definición, el fenotipo dominante.

Mendel avanzó un paso más para demostrar que la clase de individuos de la F_2 que manifestaba el fenotipo dominante estaba compuesta en realidad por dos subclases genéticamente distintas. En este caso, él estaba analizando el color de la semilla. En el guisante, el color de la semilla está determinado por la constitución genética de la propia semilla, y no por la del parental femenino, como ocurre en algunas otras especies vegetales. Esta autonomía resulta muy útil, porque el investigador puede considerar cada guisante como un individuo y observar directamente el fenotipo, sin necesidad de hacerlo crecer hasta dar una nueva planta, como ocurre en el caso del color de la flor. También significa que pueden analizarse muchos más individuos y que los estudios pueden extenderse a las generaciones posteriores. Los colores de las semillas utilizados por Mendel fueron el amarillo y el verde. Cruzó una línea pura de semillas amarillas con otra de semillas verdes y observó que todos los guisantes de la F_1 eran amarillos. Simbólicamente:

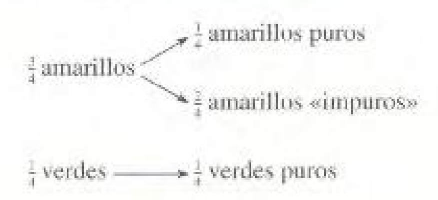
P amarillo × verde
↓
F_1 todos amarillos

Así, por definición, amarillo es el fenotipo dominante y verde es el recesivo.

Mendel desarrolló plantas F_1 a partir de estos guisantes de la F_1 y dejó que se autopolinizaran. Los guisantes que se desarrollaron en las plantas de la F_1 constituían la generación F_2. Observó que en las vainas de las plantas de la F_1, tres cuartas partes de los guisantes F_2 eran amarillos y una cuarta parte eran verdes:

F_1 todos amarillos (autocruzamiento)
F_2 $\frac{3}{4}$ amarillos
$\frac{1}{4}$ verdes

De nuevo, encontramos aquí una proporción fenotípica 3:1 en la F_2. Mendel tomó una muestra de 519 guisantes amarillos de la F_2 y los sembró para obtener plantas a partir de ellos. Cada una de estas plantas de la F_2 se autopolinizó, anotándose el tipo de guisantes que desarrollaron. Mendel comprobó que 166 de las plantas produjeron sólo guisantes amarillos, mientras que las restantes 353 plantas produjeron una mezcla de guisantes amarillos y verdes en proporción 3:1. También hizo crecer plantas a partir de guisantes verdes de la F_2 que, tras la autopolinización, dieron lugar sólo a guisantes verdes. En resumen, todos los guisantes verdes de la F_2 eran evidentemente líneas puras, igual que la línea parental verde. Pero de los guisantes amarillos de la F_2, dos tercios eran como los amarillos de la F_1 (que producían semillas amarillas y verdes en proporción 3:1) y un tercio eran como la línea pura parental amarilla. Así pues, el análisis de estas autofecundaciones reveló que bajo la aparente proporción fenotípica 3:1 de la generación F_2 existía una proporción 1:2:1 subyacente:



$\frac{1}{4}$ verdes → $\frac{1}{4}$ verdes puros

Estudios posteriores demostraron que la proporción 1:2:1 está presente en todas las proporciones fenotípicas observadas por Mendel. Así, el problema consistía realmente en explicar la proporción 1:2:1. La explicación de Mendel constituye un ejemplo clásico de formulación, a partir de una observación, de un modelo creativo o hipótesis, susceptible de comprobación mediante nuevos experimentos. Mendel dedujo la siguiente explicación:

1. *La existencia de los genes*. Existen determinantes hereditarios de naturaleza particulada. A estos determinantes los llamamos hoy día *genes*.

2. *Los genes van en parejas*. Los fenotipos alternativos para un carácter están determinados por formas distintas de un solo tipo de gen. Las diferentes formas de un gen se denominan **alelos**. En las plantas adultas de guisante, cada tipo de gen está presente por duplicado en cada célula, constituyendo un **par génico**. En plantas distintas, el par génico puede estar constituido por los mismos alelos o por alelos distintos de ese gen. Aquí, el razonamiento de Mendel fue obvio: por ejemplo, las plantas de la F_1 debían contener un alelo responsable del fenotipo dominante y otro alelo responsable del fenotipo recesivo, que sólo se manifestaría en generaciones posteriores.

3. *Principio de la segregación*. Los miembros del par génico segregan (se separan) de forma igualitaria entre los gametos (óvulos y espermatozoides).

4. *Contenido gamético*. Como consecuencia de lo anterior, cada gameto contiene un solo miembro de cada par génico.

5. *Fecundación al azar*. La unión de un gameto de cada parental para formar la primera célula (**cigoto**) de un nuevo individuo descendiente ocurre al azar, es decir, los gametos se combinan independientemente de cuál sea el miembro (alelo) del par génico que contengan.

Estas conclusiones pueden ilustrarse esquemáticamente, para un caso general, usando *A* para representar al alelo que determina el fenotipo dominante y *a* para representar al alelo del fenotipo recesivo (como hizo Mendel). El uso de *A* y *a* es similar al que hacen los matemáticos de los símbolos para representar entidades abstractas de varios tipos. En la Figura 2-6, se utilizan estos símbolos para ilustrar cómo las cinco conclusiones citadas anteriormente explican la proporción 1:2:1. Como se ha mencionado en el Capítulo 1, los miembros de un par génico se separan por una barra inclinada (/), que se usa para indicar que, de hecho, forman una pareja. La barra inclinada también sirve como un cromosoma simbólico para recordarnos que el par génico se encuentra situado en un lugar concreto de un par cromosómico.

El modelo completo da un sentido lógico a los datos. Sin embargo, se han desechado muchos hermosos modelos una vez que se les ha sometido a comprobación. La siguiente tarea de Mendel consistió en comprobar su modelo. La llevó a cabo realizando cruzamientos en los que estudiaba el color de las semillas, tomando una planta de la F_1 formada a partir de una semilla amarilla y cruzándola con una planta formada a partir de una semilla verde. El modelo predice una proporción 1:1 de guisantes amarillos y verdes en la siguiente generación. Si llamamos *Y* al alelo que determina el fenotipo dominante (semillas amarillas) e *y* al alelo que determina el fenotipo recesivo (semillas verdes), podemos representar las predicciones de Mendel de la forma en que se muestra en la Figura 2-7. En este experimento, Mendel obtuvo 58 semillas amarillas (*Y/y*) y 52 verdes (*y/y*), valores que se aproximan mucho a la proporción 1:1 predicha, y que confirman la segregación igualitaria de *Y* e *y* en el individuo de la F_1. Este concepto de **segregación igualitaria** se conoce formalmente como la **primera Ley de Mendel**: *los dos miembros (alelos) de un par génico se distribuyen separadamente (segregan) entre los gametos; así, la mitad de los gametos contiene un miembro del par y la otra mitad contiene el otro miembro.*

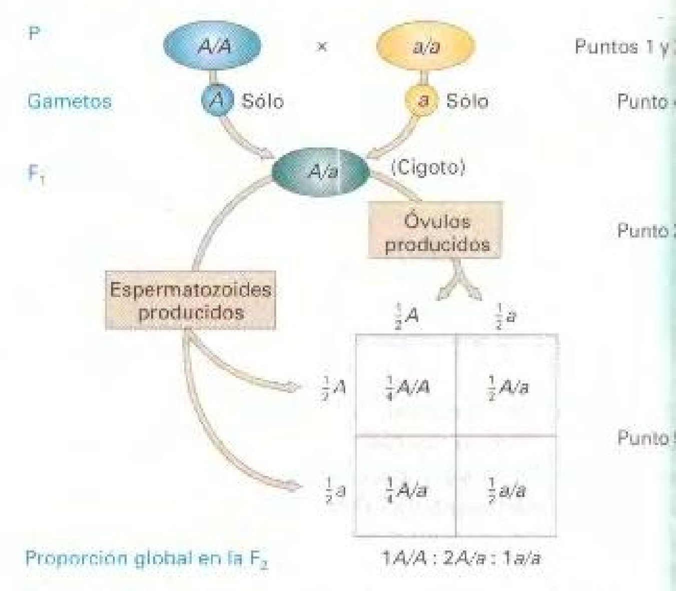


Figura 2-6. Modelo de Mendel de los determinantes hereditarios de una diferencia en un carácter en las generaciones P, F_1 y F_2. Los cinco puntos son los que aparecen en el texto.

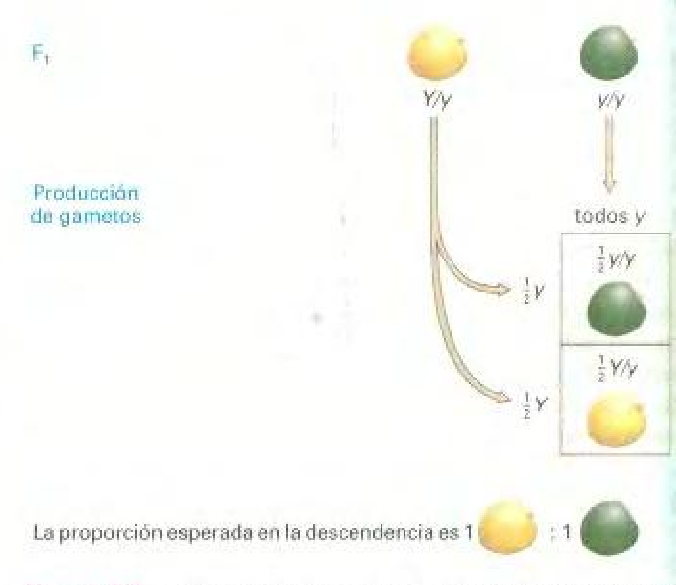


Figura 2-7. Utilización de líneas puras para deducir genotipos y relaciones de dominancia y recesividad.

Es conveniente introducir ahora algunos términos nuevos. Los individuos representados como *A/a* se denominan **heterocigotos** o, a veces, **híbridos**, mientras que los individuos de una línea pura se denominan **homocigotos**. En tales vocablos, *hetero-* significa «diferente» y *homo-* significa «idéntico». Así, de una planta *A/A* se dice que es **homocigótica dominante**, y una planta *a/a* es homocigótica para el alelo recesivo, u **homocigótica recesiva**. Como se vio en el Capítulo 1, la constitución genética respecto a uno o varios caracteres en estudio se denomina **genotipo**. Por ejemplo, *Y/Y* e *Y/y* son genotipos diferentes, aunque ambos tipos de semillas presenten el mismo fenotipo (amarillo). En tal situación, puede pensarse en el fenotipo simplemente como la manifestación externa del genotipo subyacente. Observe que en la proporción fenotípica 3:1 de la F_2 subyace una proporción genotípica 1:2:1 de *Y/Y*:*Y/y*:*y/y*.

Es conveniente hacer notar que, en términos estrictos, las expresiones *dominante* y *recesivo* deben aplicarse al fenotipo. El fenotipo dominante se establece por la apariencia de la F_1. Sin embargo, un fenotipo (que es una mera descripción) no puede en realidad ejercer dominancia. Mendel demostró que la dominancia de un fenotipo sobre otro se debe realmente a la dominancia de un miembro del par génico sobre el otro.

Hagamos una pausa para profundizar en la importancia de este trabajo. Lo que Mendel hizo fue desarrollar un esquema analítico para la identificación de genes que regulan cualquier carácter o función biológica. Tomemos como ejemplo el color de los pétalos. Comenzando con dos fenotipos diferentes (púrpura y blanco) de un carácter (color del pétalo), Mendel fue capaz de demostrar que la diferencia estaba causada por un par génico. Los genetistas modernos dirían que el análisis de Mendel había identificado un gen para el color del pétalo. ¿Qué significa esto? Significa que, en estos organismos, hay un gen que ejerce un efecto profundo sobre el color de los pétalos. Éste puede existir en diferentes formas: una forma dominante (representada por *C*), que determina pétalos púrpuras, y una forma recesiva (representada por *c*), que determina pétalos blancos. Las formas *C* y *c* son *alelos* (formas alternativas) de ese gen responsable del color de los pétalos. Se les asigna la misma letra para indicar que los alelos son formas de un gen. En otras palabras, podemos decir que hay un gen, llamado fonéticamente «ce», con los alelos *C* y *c*. Cualquier planta individual de guisante tendrá siempre dos copias del gen «ce», que forman un par génico, y los miembros reales del par génico pueden ser *C/C*, *C/c* o *c/c*. Observe que, aunque los dos alelos de un gen pueden producir efectos distintos, ambos afectan al mismo carácter. La ruta básica del análisis mendeliano para un carácter se resume en el Cuadro 2-2.

COROLARIO

La existencia de genes se infirió originalmente (y todavía se infiere hoy día) observando proporciones matemáticas precisas en la descendencia de dos individuos parentales genéticamente diferentes.

Bases moleculares de la Genética mendeliana

Consideremos algunos de los términos de Mendel en el contexto de la célula. Primero, ¿cuál es la naturaleza molecular de los alelos? Cuando alelos como *A* y *a* se analizan a nivel de DNA empleando técnicas modernas, generalmente se descubre que éstos son idénticos en gran parte de su secuencia y que sólo se diferencian en uno o pocos nucleótidos de los millares que los conforman. Vemos, por tanto, que los alelos son realmente versiones diferentes del mismo gen básico. Visto de otra forma, gen es un término genérico, y alelo un término específico (el gen para el color del guisante tiene dos alelos, responsables de los colores amarillo y verde). El siguiente esquema representa el DNA de dos alelos de un gen. La letra «x» representa una diferencia en la secuencia de nucleótidos.

Alelo 1

Alelo 2 X

¿Qué hay acerca de la dominancia? Hemos visto que, aunque los términos dominante y recesivo se definen en función del fenotipo, los fenotipos reflejan claramente las diferentes acciones de los alelos. Por tanto, podemos usar legítimamente los términos *alelo dominante* y *alelo recesivo* para designar a los determinantes de los fenotipos dominante y recesivo. Existen varios factores moleculares distintos que pueden hacer que un alelo sea dominante o recesivo. Una situación común es que el alelo dominante determine una proteína funcional y que el alelo recesivo provoque la ausencia de la proteína o dé lugar a una forma

CUADRO 2-2. Resumen del *modus operandi* para establecer un modo de herencia mendeliana simple

Procedimiento experimental	1. Elegir líneas puras que se diferencien en un carácter (flores púrpura y flores blancas). 2. Cruzar ambas líneas. 3. Autopolinizar los individuos de la F_1.
Resultados:	La F_1 es toda púrpura; en la F_2, $\frac{3}{4}$ púrpuras y $\frac{1}{4}$ blancas.
Inferencias:	1. La diferencia en el carácter está controlada por un gen principal para el color de la flor. 2. El alelo dominante de este gen determina pétalos púrpuras; el alelo recesivo, pétalos blancos.

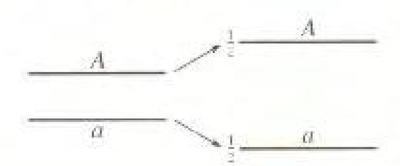
Interpretación simbólica:

Carácter	Fenotipo	Genotipo	Alelo	Gen
Color de la flor	Púrpura (dominante)	*C/C* (homocigoto dominante) *C/c* (heterocigoto)	*C* (dominante) *c* (recesivo)	Gen para el color de la flor
	Blanco (recesivo)	*c/c* (homocigoto recesivo)		

no funcional de la proteína. En el heterocigoto, la proteína producida por el alelo funcional es suficiente para las necesidades normales de la célula; así, el alelo funcional actúa como dominante. Un ejemplo de la dominancia de un alelo funcional en un heterocigoto se presentó al tratar el caso del albinismo en el Capítulo 1. La idea general puede presentarse como una fórmula:

A	más	*a*	=	*A/a*
(proteína funcional)	más	(proteína no funcional)	=	función

¿Cuál es la base celular de primera Ley de Mendel, la segregación igualitaria de los alelos durante la formación de los gametos? En un organismo diploide como el guisante, todas las células del organismo contienen dos dotaciones cromosómicas. Los gametos, sin embargo, son haploides y contienen una sola dotación. Los gametos se forman como consecuencia de divisiones celulares especializadas de células diploides del tejido reproductor (ovarios y anteras). Estas divisiones celulares especializadas están acompañadas por divisiones de los núcleos que reciben la denominación de **meiosis**. Los movimientos cromosómicos estrictamente programados que ocurren durante la meiosis provocan la distribución igualitaria de los alelos a los gametos. En la meiosis de un heterocigoto *A/a*, el cromosoma portador de *A* es empujado en la dirección contraria a la del cromosoma portador de *a*: por tanto, la mitad de los gametos resultantes llevan *A* y la otra mitad, *a*. Esta situación puede representarse simplificadamente de la siguiente manera (la meiosis se detallará en el Capítulo 3):



La fuerza que empuja a los cromosomas hacia los polos celulares está generada por el huso acromático, una serie de microtúbulos constituidos por la proteína tubulina. Los microtúbulos se unen a los centrómeros de los cromosomas mediante interacción con una serie específica de proteínas localizadas en el propio centrómero. La coordinación de estas interacciones moleculares es compleja, pero constituye la base de las leyes de la transmisión hereditaria en los eucariotas.

Plantas que difieren en dos caracteres

Los experimentos de Mendel descritos hasta el momento son el resultado de cruzamientos entre dos líneas puras parentales que difieren en un solo carácter. Como hemos visto, tales líneas producen descendientes F_1 heterocigotos para un gen (genotipo *A/a*). Estos heterocigotos se denominan a veces **monohíbridos**. La autopolinización o el cruzamiento cruzado entre individuos de la F_1 heterocigotos idénticos (simbólicamente *A/a* × *A/a*) se denomina **cruzamiento monohíbrido**, y fue este tipo de cruzamiento el que produjo en la descendencia las interesantes proporciones 3:1 que sugirieron el principio de la segregación igualitaria. Mendel continuó su trabajo analizando la descendencia de líneas puras que diferían en *dos* caracteres. Ahora necesitamos una simbología más general que nos permita representar genotipos que incluyan dos genes. Si dos genes están en diferentes cromosomas, los pares génicos se separan por un punto y coma, por ejemplo, *A/a* ; *B/b*. Si están en el mismo cromosoma, los alelos de uno de los cromosomas se escriben juntos y se separan de los alelos del otro cromosoma con una barra inclinada, por ejemplo, *AB/ab* o *Ab/aB*. No existe un símbolo aceptado para la situación en la cual se desconoce si los genes están en el mismo o en distintos cromosomas. Para esta situación, separaremos los genes con un punto, por ejemplo, *A/a* · *B/b*. Al doble heterocigoto *A/a* · *B/b* se le conoce como **dihíbrido**. Estudiando **cruzamientos dihíbridos** (*A/a* · *B/b* × *A/a* · *B/b*), Mendel descubrió otro principio importante de la herencia.

Los dos caracteres concretos con los que Mendel comenzó este análisis fueron la forma y el color de las semillas. Ya hemos tratado sobre el cruzamiento monohíbrido para el color de la semilla (*Y/y* × *Y/y*), que produjo una proporción de 3 amarillos:1 verde entre la descendencia. Los fenotipos de la forma de la semilla eran liso (determinado por el alelo *R*) y rugoso (determinado por el alelo *r*). El cruzamiento monohíbrido *R/r* × *R/r* produjo una proporción en la descendencia de 3 lisos:1 rugoso (Cuadro 2-1 y Fig. 2-8). Para realizar un cruzamiento dihíbrido, Mendel partió de dos líneas parentales puras. Una de ellas tenía semillas rugosas y amarillas. Como Mendel carecía del concepto de localización cromosómica de los genes, debemos usar el pun-



Figura 2-8. Guisantes lisos (*R/R* o *R/r*) y rugosos (*r/r*) en la vaina de una planta heterocigótica (*R/r*) autopolinizada. En esta vaina, las proporciones fenotípicas resultan ser exactamente 3:1, precisamente las esperadas como media entre los descendientes de una autopolinización como ésta. (Estudios moleculares recientes han demostrado que el alelo para el fenotipo rugoso empleado por Mendel se debe a la inserción en el gen de un fragmento de DNA móvil, del tipo que trataremos en el Capítulo 20.) (Madan K. Bhattacharyya.)

lo para representar este genotipo como $Y/Y \cdot r/r$. La otra línea tenía semillas lisas y verdes, de genotipo $y/y \cdot R/R$. El cruzamiento entre estas dos líneas produjo semillas F_1 dihíbridas de genotipo $R/r \cdot Y/y$ que, según Mendel descubrió, eran lisas y amarillas. Este resultado demostró que la dominancia de *R* sobre *r* y la de *Y* sobre *y* no se veían afectadas por la heterocigosidad en cualquiera de los genes del dihíbrido $R/r \cdot Y/y$. A continuación, Mendel realizó el cruzamiento dihíbrido permitiendo que se autopolinizara el dihíbrido de la F_1 para obtener la generación F_2. Las semillas de la F_2 eran de cuatro tipos distintos, apareciendo en las siguientes proporciones:

$\frac{9}{16}$ lisas amarillas
$\frac{3}{16}$ lisas verdes
$\frac{3}{16}$ rugosas amarillas
$\frac{1}{16}$ rugosas verdes

como se muestra en la Figura 2-9. Esta proporción 9:3:3:1, algo inesperada, parece mucho más compleja que las simples proporciones 3:1 de los cruzamientos monohíbridos. ¿Cuál podía ser la explicación? Antes de intentar explicar la proporción 9:3:3:1, Mendel realizó cruzamientos dihíbridos que afectaban a otras combinaciones de caracteres y encontró que *todos* los individuos dihíbridos de la F_1 producían descendientes en proporciones 9:3:3:1 similares a las encontradas para el color y la forma de la semilla. La proporción 9:3:3:1 era otro patrón hereditario constante que necesitaba ser convertido en una idea.

Mendel sumó el número de individuos pertenecientes a ciertas clases fenotípicas de la F_2 (los números se muestran en la Figura 2-9) para determinar si las proporciones 3:1 monohíbridas de la F_2 todavía se mantenían. Se dio cuenta de que, con respecto a la forma de la semilla, había 423 lisas (315 + 108) y 133 rugosas (101 + 32). Este resultado se aproxima a la proporción 3:1. Con respecto al color de la semilla, había 416 amarillas (315 + 101) y 140 verdes (108 + 32), también una proporción muy cercana a 3:1. La presencia de estas dos proporciones 3:1 escondidas en la proporción 9:3:3:1 era, indudablemente, lo que la perspicacia de Mendel necesitaba para explicar la proporción 9:3:3:1, porque se dio cuenta de que ésta no era más que la combinación aleatoria de dos proporciones 3:1 independientes. Una forma de visualizar la combinación aleatoria de estas dos proporciones es utilizar un diagrama ramificado, de la siguiente forma:



Las proporciones combinadas se calculan multiplicando a lo largo de las ramas del diagrama porque, por ejemplo, $\frac{3}{4}$ de $\frac{3}{4}$ se calcula como $\frac{3}{4} \times \frac{3}{4}$, que es igual a $\frac{9}{16}$. Estas multiplicaciones nos dan las siguientes proporciones:

$\frac{3}{4} \times \frac{3}{4} = \frac{9}{16}$ lisas amarillas
$\frac{3}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{3}{16}$ lisas verdes
$\frac{1}{4} \times \frac{3}{4} = \frac{3}{16}$ rugosas amarillas
$\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{16}$ rugosas verdes

Estas fracciones constituyen la proporción 9:3:3:1 que estamos tratando de explicar. Sin embargo, ¿no es todo ello un simple juego de números? ¿Cuál es el significado biológico de la combinación de dos proporciones 3:1? El modo en que Mendel enunció su explicación aporta de hecho un mecanismo biológico. En lo que se conoce como la **segunda Ley de Mendel**, concluyó que *los miembros (alelos) de genes distintos segregan independientemente durante la formación de los gametos*. Con nuestro conocimiento actual sobre la localización cromosómica de los genes, sabemos que esta «ley» sólo es válida en algunos casos. La mayor parte de los casos de independencia se observa al analizar genes situados en cromosomas diferentes. Generalmente, genes situados en un mismo cromosoma no segregan independientemente, porque tienden a mantenerse juntos en el mismo cromosoma. Por tanto, la versión moderna de la segunda Ley de Mendel se enuncia como en el siguiente corolario.

COROLARIO

Los alelos de genes situados en cromosomas distintos segregan de forma independiente durante la meiosis.

Hemos explicado la proporción 9:3:3:1 como la combinación de dos proporciones fenotípicas 3:1. Pero la segunda Ley de Mendel está relacionada con la distribución de los alelos a los gametos. ¿Puede explicarse la proporción 9:3:3:1 basándose en

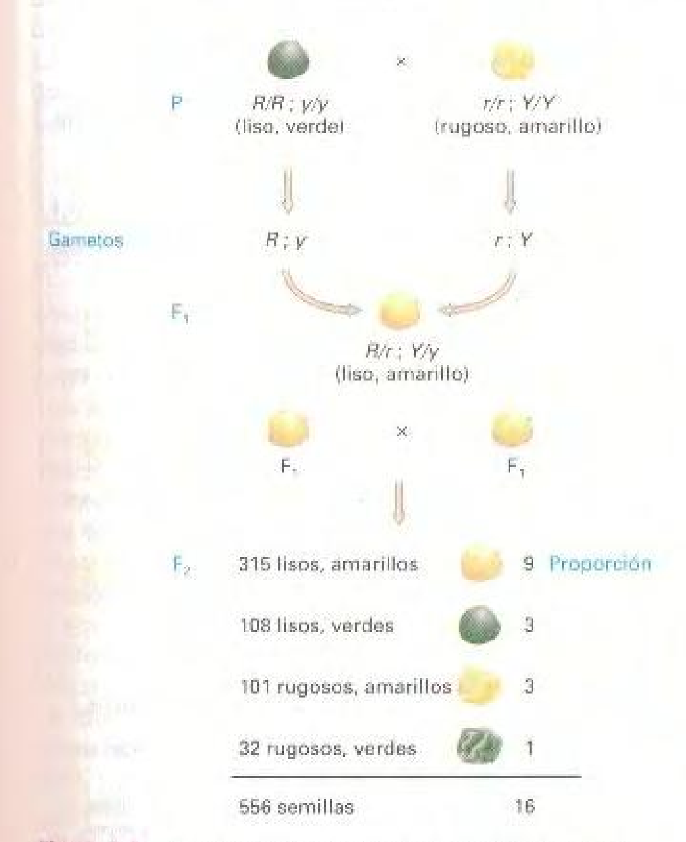
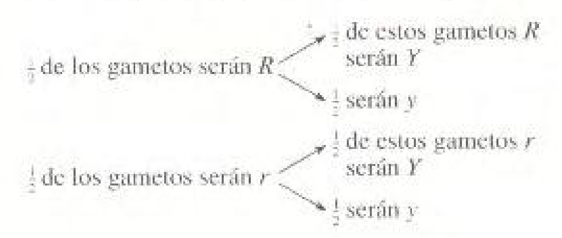


Figura 2-9. La generación F_2 resultante de un cruzamiento dihíbrido.

los genotipos de los gametos? Consideremos los gametos producidos por el dihíbrido de la F_1 *R/r* ; *Y/y* (el punto y coma indica que ahora estamos asumiendo que los genes están en cromosomas distintos). Comenzaremos usando, de nuevo, un diagrama ramificado, porque ilustra visualmente la independencia. Combinando las leyes de Mendel de la segregación igualitaria y la distribución independiente, podemos predecir que



La multiplicación a lo largo de las ramas nos da las proporciones de gametos:

$\frac{1}{4}$ *R* ; *Y*
$\frac{1}{4}$ *R* ; *y*
$\frac{1}{4}$ *r* ; *Y*
$\frac{1}{4}$ *r* ; *y*

Estas proporciones son un resultado directo de la aplicación de las dos Leyes de Mendel. Sin embargo, todavía no hemos llegado a la proporción 9:3:3:1. El siguiente paso es reconocer que tanto los gametos masculinos como los femeninos mostrarán las mismas proporciones que acaban de presentarse, porque Mendel no especificó reglas diferentes para la formación de los gametos masculinos y femeninos. Los cuatro tipos de gametos femeninos serán fecundados al azar por los cuatro tipos de gametos masculinos para obtener la F_2, y el mejor modo de presentar esto gráficamente es utilizar una cuadrícula 4 × 4, llamada *diagrama de Punnett*, como se muestra en la Figura 2-10. Estas cuadrículas son útiles en Genética porque sus proporciones pueden dibujarse de acuerdo con las proporciones genéticas en estudio, y así se obtiene una representación visual de los datos. En el diagrama de Punnett de la Figura 2-10, por ejemplo, vemos que las áreas de los compartimientos que representan las posibles fusiones gaméticas son, en cada caso, la dieciseisava parte del área total de la cuadrícula, simplemente porque las filas y las columnas se dibujaron de manera que correspondieran a las proporciones gaméticas. Como muestra el diagrama de Punnett, la F_2 contiene varios genotipos, pero sólo hay cuatro fenotipos, con proporciones 9:3:3:1. Vemos así que cuando trabajamos a nivel de la formación de los gametos, las Leyes de Mendel explican tanto los fenotipos de la F_2 como los genotipos que subyacen en ellos.

Mendel fue un científico minucioso: siguió comprobando su principio de la segregación independiente de otras formas. El modo más directo apuntaba a la proporción gamética 1:1:1:1 que debía producir el dihíbrido de la F_1 *R/r* ; *Y/y*, porque esta proporción surgía de su principio de la segregación independiente y constituía la base biológica de la razón 9:3:3:1 de la F_2, como hemos demostrado con el diagrama de Punnett. Mendel razonó que, si de hecho había una proporción 1:1:1:1 de gametos *R* ; *Y*, *R* ; *y*, *r* ; *Y*, y *r* ; *y*, entonces, si cruzaba el dihíbrido de la F_1 con una planta de genotipo *r/r* ; *y/y*, que produce gametos que sólo contienen alelos recesivos (genotipo *r* ; *y*), las proporciones de la descendencia de este cruzamiento debían ser una manifestación directa de las proporciones gaméticas del dihíbrido; en otras palabras,

$\frac{1}{4}$ *R/r* ; *Y/y*
$\frac{1}{4}$ *R/r* ; *y/y*
$\frac{1}{4}$ *r/r* ; *Y/y*
$\frac{1}{4}$ *r/r* ; *y/y*

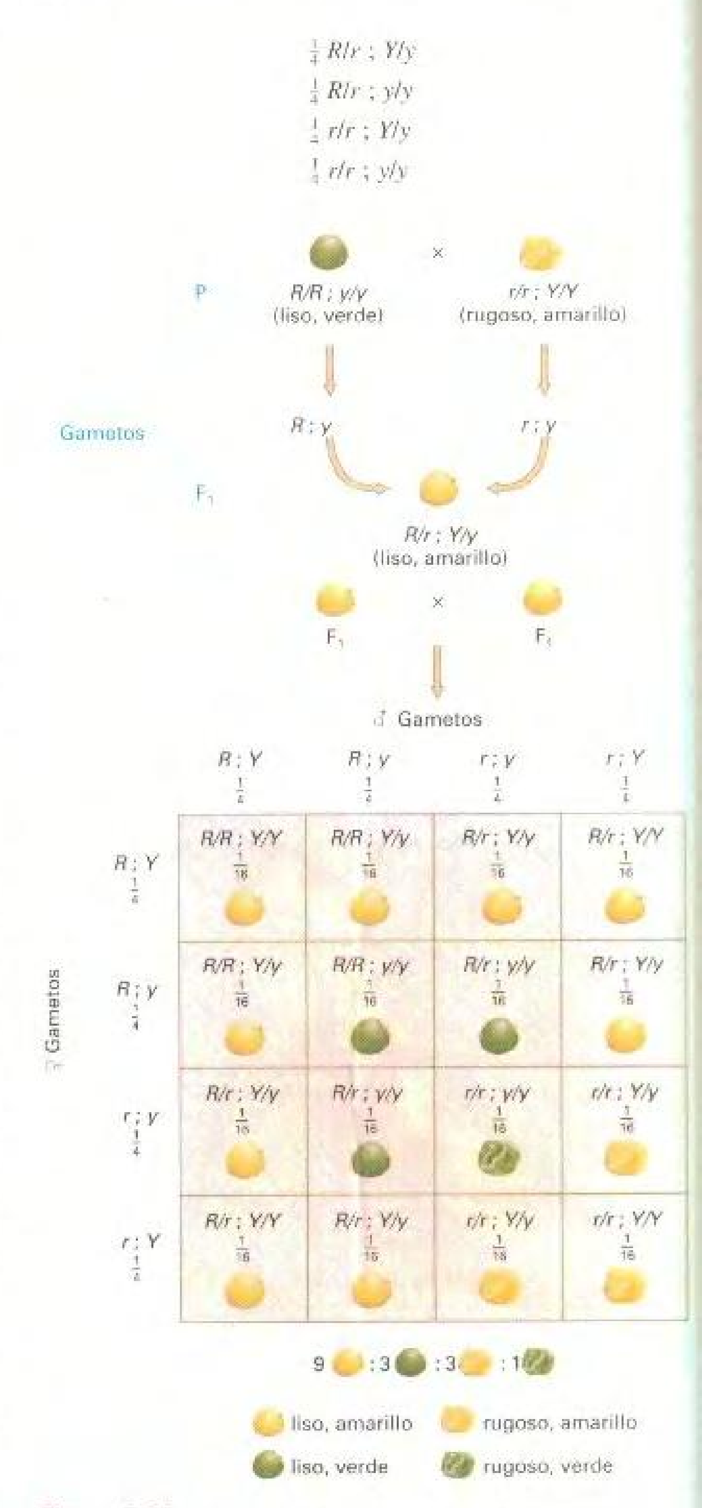


Figura 2-10. Diagrama de Punnett, que muestra las constituciones genotípica y fenotípica predichas para la generación F_2 de un cruzamiento dihíbrido.

Éstas fueron las proporciones que Mendel obtuvo, perfectamente coherentes con sus predicciones. Se obtuvieron resultados similares en todos los cruzamientos dihíbridos, y éstos y todos los otros tipos de pruebas que realizó, demostraron que había concebido un modelo sólido, que explicaba los patrones de herencia observados en sus cruzamientos con el guisante.

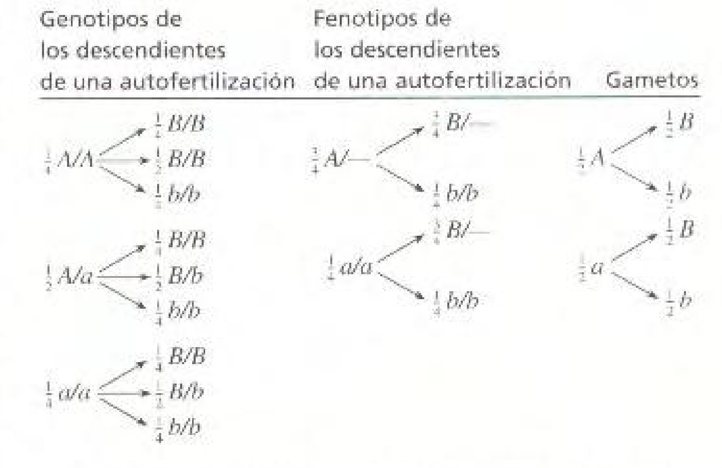
El tipo de cruzamiento que acabamos de considerar, de un individuo de genotipo desconocido con un homocigoto recesivo completo, se denomina actualmente **cruzamiento de prueba**. El individuo recesivo se denomina **individuo de prueba**. Puesto que este individuo sólo aporta alelos recesivos, el genotipo de los gametos producidos por el individuo desconocido puede deducirse a partir de los fenotipos de la descendencia.

Cuando se redescubrieron los resultados de Mendel en 1900, sus principios se analizaron en un amplio espectro de organismos eucarióticos (organismos cuyas células contienen núcleo). Los resultados de estas pruebas demostraron que los principios mendelianos eran de aplicación general. Las proporciones mendelianas (como 3:1, 1:1, 9:3:3:1 y 1:1:1:1) fueron exhaustivamente comprobadas, sugiriendo que la segregación igualitaria y la segregación independiente son procesos hereditarios fundamentales observados, de forma general, en la naturaleza. Las leyes de Mendel no son meramente leyes sobre los guisantes, sino leyes generales sobre la genética de los organismos eucarióticos. La estrategia experimental utilizada por Mendel se puede aplicar de forma general a las plantas. Sin embargo, en algunas plantas y en la mayoría de los animales, resulta imposible emplear la autofertilización. Este problema puede evitarse cruzando genotipos idénticos. Por ejemplo, un animal F_1 resultante del cruzamiento entre parentales de diferentes líneas puras puede cruzarse con sus hermanos (o hermanas) para producir una F_2. Los individuos de la F_1 son idénticos para los genes en estudio, de modo que el cruzamiento F_1 es equivalente a una autofertilización.

Métodos para el cálculo de proporciones genéticas

Una parte importante de la Genética actual se ocupa de la predicción de los tipos de descendientes producidos tras un cruzamiento y del cálculo de sus frecuencias esperadas, en otras palabras, de su probabilidad. Ya hemos examinado dos métodos para hacer esto: los diagramas de Punnett y los diagramas ramificados. Los diagramas de Punnett pueden emplearse para demostrar la existencia de patrones hereditarios basados en un gen, dos genes (como en la Fig. 2-10) o más. Tales diagramas constituyen una buena herramienta gráfica para representar a la descendencia, pero realizarlos consume mucho tiempo. Incluso la ejecución del diagrama de Punnett de 16 compartimientos mostrado en la Figura 2-10 lleva tiempo, pero para un trihíbrido hay 2^3, es decir, 8 tipos gaméticos diferentes, y el diagrama de Punnett tendría 64 compartimientos en este caso. El diagrama ramificado (parte superior derecha de la página) es más fácil, y puede adaptarse a la determinación de proporciones gaméticas, fenotípicas o genotípicas, como se ilustra para un dihíbrido *A/a* ; *B/b* (en el diagrama, el guión significa que el alelo puede estar presente en cualquiera de sus formas, dominante o recesivo).

Observe que el «árbol» de ramas de los genotipos es bastante difícil de manejar incluso en este caso, que usa dos genes, porque hay $3^2 = 9$ genotipos. Para tres genes, hay $3^3 = 27$ genotipos posibles.



La aplicación de reglas estadísticas simples es el tercer método para calcular las probabilidades (frecuencias esperadas) de los fenotipos o los genotipos específicos resultantes de un cruzamiento. Las dos reglas de probabilidad que se necesitan son la **regla del producto** y la **regla de la suma**, que consideraremos en este orden.

COROLARIO

La regla del producto establece que la probabilidad de que ocurran a la vez dos hechos independientes es el producto de sus probabilidades independientes.

Los posibles resultados de tirar los dados siguen las reglas del producto, porque el resultado obtenido en un dado es independiente del resultado de los otros dados. Consideremos como ejemplo dos dados y calculemos la probabilidad de que tras tirarlos, nos salgan dos cuatros. La probabilidad de que nos salga un cuatro en un dado es $\frac{1}{6}$ porque el dado tiene seis caras, sólo una de las cuales es un cuatro. Esta probabilidad se representa de la siguiente forma:

$$p \text{ (de que salga un cuatro)} = \tfrac{1}{6}$$

Así, mediante el uso de la regla del producto, la probabilidad de que nos salga un cuatro en ambos dados es $\frac{1}{6} \times \frac{1}{6} = \frac{1}{36}$, que se escribe

$$p \text{ (de que salgan dos cuatros)} = \tfrac{1}{6} \times \tfrac{1}{6} = \tfrac{1}{36}$$

COROLARIO

La regla de la suma establece que la probabilidad de que ocurra uno de dos posibles sucesos excluyentes es la suma de sus probabilidades independientes.

La regla del producto se refiere a la probabilidad de que ocurran los resultados A y B. La regla de la suma se refiere a la

probabilidad de que ocurran los resultados A *o* B. También podemos emplear el ejemplo de los dados para explicar la regla de la suma. Ya hemos calculado que la probabilidad de que salgan dos cuatros es $\frac{1}{36}$, y haciendo el mismo tipo de cálculo, resulta obvio que la probabilidad de que salgan dos cincos será la misma, $\frac{1}{36}$. Ahora podemos calcular la probabilidad de que nos salgan dos cuatros o dos cincos. Como los resultados son mutuamente excluyentes, la regla de la suma nos dice que la respuesta es $\frac{1}{36} + \frac{1}{36} = \frac{1}{18}$. Esta probabilidad se representa de la siguiente forma:

$$p \text{ (de que salgan dos cuatros o dos cincos)} = \frac{1}{36} + \frac{1}{36} = \frac{1}{18}$$

Consideremos ahora un ejemplo genético. Supongamos que tenemos dos plantas, una de genotipo *A/a* ; *b/b* ; *C/c* ; *D/d* ; *E/e* y otra de genotipo *A/a* ; *B/b* ; *C/c* ; *d/d* ; *E/e*. Supongamos también que, tras el cruzamiento entre estas dos plantas, queremos recuperar una planta de genotipo *a/a* ; *b/b* ; *c/c* ; *d/d* ; *e/e* (quizás para utilizarla en un cruzamiento de prueba). Para calcular cuántos descendientes debemos sembrar para tener una probabilidad razonable de obtener el genotipo deseado, necesitamos calcular la proporción de descendientes que esperamos que tengan dicho genotipo. Si suponemos que todos los genes segregan independientemente podemos hacer este cálculo fácilmente utilizando la regla del producto. Consideraremos las cinco parejas independientemente, como si realizáramos cinco cruzamientos distintos, y multiplicaremos las probabilidades obtenidas para llegar a la respuesta final.

De *A/a* × *A/a*, la cuarta parte de los descendientes será *a/a* (véanse los cruzamientos de Mendel); de *b/b* × *B/b*, la mitad de los descendientes será *b/b*; de *C/c* × *C/c*, la cuarta parte de los descendientes será *c/c*; de *D/d* × *d/d*, la mitad será *d/d*; de *E/e* × *E/e*, la cuarta parte será *e/e*. Así, la probabilidad total (o frecuencia esperada) del genotipo *a/a* ; *b/b* ; *c/c* ; *d/d* ; *e/e* será $\frac{1}{4} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{256}$. Sabremos así que necesitaremos analizar cientos de descendientes para contar con la probabilidad de obtener al menos una planta del genotipo deseado. Este cálculo de probabilidades se puede emplear también para predecir frecuencias fenotípicas o gaméticas. De hecho, hay miles de usos de este método en el análisis genético, muchos de los cuales los encontraremos en capítulos posteriores.

Cromosomas sexuales y herencia ligada al sexo

La mayoría de los animales y muchas plantas muestran dimorfismo sexual; en otras palabras, un individuo puede ser macho o hembra. En la mayoría de estos casos, el sexo está determinado por cromosomas sexuales especiales. En estos organismos hay dos clases de cromosomas, los **cromosomas sexuales** y los **autosomas** (los cromosomas que no son los sexuales). Las reglas de la herencia consideradas hasta ahora, con el análisis de Mendel como ejemplo, son las reglas de los autosomas. La mayoría de los cromosomas de un genoma son autosomas. Los cromosomas sexuales se presentan en un número menor y, generalmente, sólo hay un par en los organismos diploides.

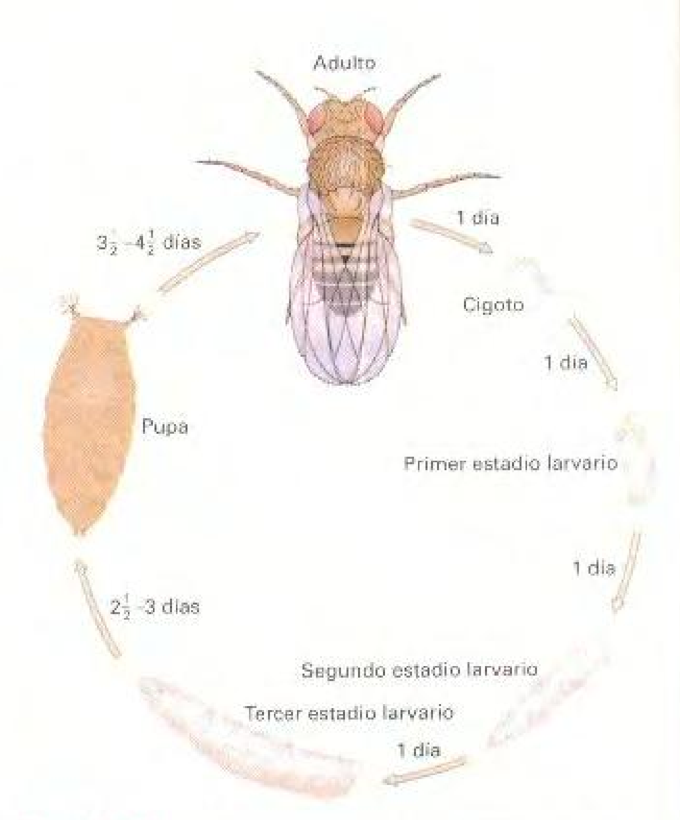


Figura 2-11. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, la mosca común del vinagre.

Veamos como ejemplo la situación en la especie humana. Las células corporales humanas tienen 46 cromosomas: 22 pares de autosomas homólogos más 2 cromosomas sexuales. En las mujeres hay un par de cromosomas sexuales idénticos, cada uno de los cuales se denomina **cromosoma X**. En los varones hay un par no idéntico, formado por los cromosomas X e Y. El **cromosoma Y** es considerablemente menor que el X. Durante la meiosis en las mujeres, los cromosomas X se emparejan y segregan como si fueran autosomas, de manera que cada óvulo recibe un cromosoma X. Se dice, por tanto, que el femenino es el **sexo homogamético**. Durante la meiosis en los varones, los cromosomas X e Y se emparejan a lo largo de una pequeña región, lo cual asegura que ambos cromosomas segreguen igualitariamente, de forma que la mitad de las células espermáticas recibirán el cromosoma X y la otra mitad el cromosoma Y. Se dice, por tanto, que el masculino es el **sexo heterogamético**.

CUADRO 2-3. Determinación cromosómica del sexo en *Drosophila* y en la especie humana

	CROMOSOMAS SEXUALES			
Especie	XX	XY	XXY	XO
Drosophila	♀	♂	♀	♂
Hombre	♀	♂	♂	♀

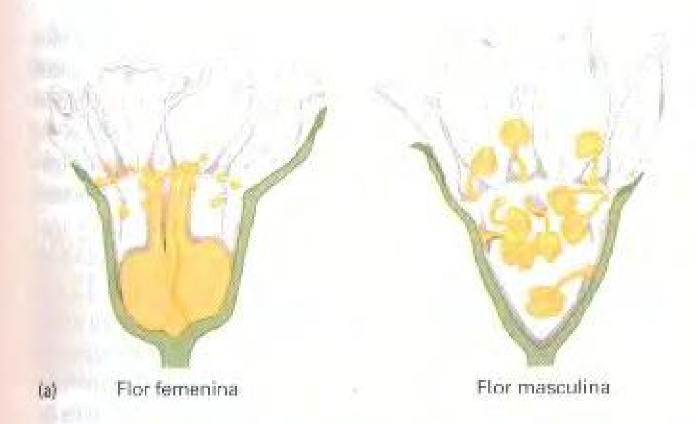




Figura 2-12. Dos especies de plantas dioicas. (a) *Osmoronia dioica*; (b) *Aruncus dioicus*. (Parte a, Leslie Bohm; parte b, Anthony Griffiths.)

La mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* ha sido uno de los organismos de investigación más importantes en Genética; su corto y sencillo ciclo de vida contribuye a su utilidad en este aspecto (Fig. 2-11). Las moscas del vinagre también tienen hembras XX y machos XY. Sin embargo, el mecanismo de determinación del sexo en *Drosophila* es diferente al de los mamíferos. En *Drosophila*, el número de cromosomas X determina el sexo: dos X dan lugar a una hembra y un X da lugar a un macho. En los mamíferos, la presencia del cromosoma Y determina el sexo masculino y la ausencia del Y determina el sexo femenino. Esta diferencia se pone de manifiesto en el fenotipo sexual de los tipos cromosómicos anormales XXY y XO, como se muestra en el Cuadro 2-3. Sin embargo, pospondremos una discusión a fondo sobre este tema hasta el Capítulo 23.

Las plantas vasculares presentan varios tipos distintos de determinación del fenotipo sexual. Las especies **dioicas** muestran dimorfismo sexual semejante al de los animales, con plantas femeninas con flores que sólo contienen ovarios y plantas masculinas con flores que sólo contienen anteras (Fig. 2-12). Algunas plantas dioicas, pero no todas, presentan una pareja de cromosomas no idénticos asociados con el sexo (y que probablemente lo determinan). De las especies con cromosomas sexuales no idénticos, una gran proporción presenta el sistema XY. Por ejemplo, la planta dioica *Melandrium album* tiene 22 cromosomas por célula: 20 autosomas más 2 cromosomas sexuales, con hembras

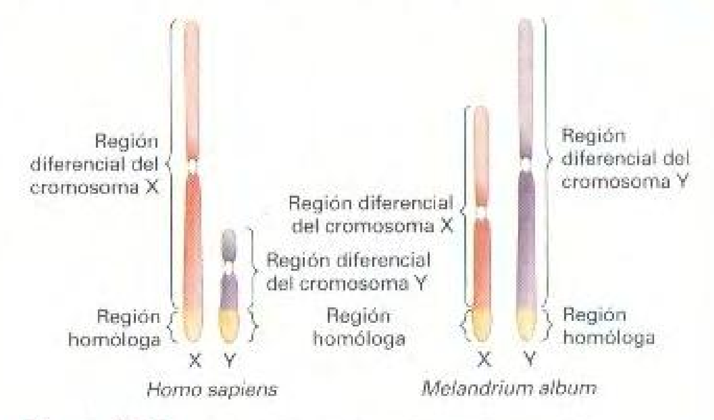


Figura 2-13. Regiones diferenciales y de emparejamiento de los cromosomas sexuales humanos y de la planta *Melandrium album*. Las regiones se localizaron observando por dónde emparejan los cromosomas durante la meiosis y por dónde no lo hacen.

XX y machos XY. Otras plantas dioicas no tienen parejas de cromosomas visiblemente diferentes; puede que tengan cromosomas sexuales, pero éstos no son distinguibles visualmente.

Los citogenetistas han dividido los cromosomas X e Y de algunas especies en regiones homólogas y no homólogas. Estas últimas se denominan regiones *diferenciales* (Fig. 2-13). Los genes de las regiones diferenciales no tienen contrapartida en el otro cromosoma sexual. En los machos, los genes de las regiones diferenciales son **hemicigóticos** («medio-cigóticos»). Los genes de la región diferencial del cromosoma X muestran un patrón de herencia denominado **ligamiento al X**: los de la región diferencial del cromosoma Y muestran **ligamiento al Y**. Los genes de la región homóloga muestran lo que podríamos llamar **ligamiento al X y al Y**. En general, se dice que los genes de los cromosomas sexuales están **ligados al sexo**.

Los genes de las regiones diferenciales de los cromosomas sexuales muestran patrones de herencia relacionados con el sexo. Los patrones de herencia de los genes de los autosomas dan lugar a descendientes masculinos y femeninos con las mismas proporciones fenotípicas, como está tipificado en los datos de Mendel (por ejemplo, ambos sexos presentarían una propor-



Figura 2-14. Una mosca *Drosophila melanogaster* de ojos rojos y otra de ojos blancos. (Carolina Biological Supply.)

ción 3:1). Sin embargo, los cruzamientos en los que se analiza la herencia de genes ligados al sexo muestran a menudo descendientes masculinos y femeninos con diferentes proporciones fenotípicas. De hecho, para genes de localización cromosómica desconocida, este patrón constituye una prueba diagnóstica experimental de que los genes en estudio están en los cromosomas sexuales. Tomemos *Drosophila* como ejemplo. En la estirpe silvestre, el color normal de los ojos es el rojo, pero se dispone de líneas puras de ojos blancos (Fig. 2-14). Esta diferencia fenotípica está determinada por dos alelos de un gen situado en la región diferencial del cromosoma X. Cuando se cruzan machos de ojos blancos con hembras de ojos rojos, toda la descendencia de la F_1 presenta ojos rojos, lo que demuestra que el alelo que determina el color blanco es recesivo. El cruzamiento de machos y hembras de la F_1 de ojos rojos da lugar a una proporción 3:1 de ojos rojos y blancos en la F_2, pero todas las moscas de ojos blancos son machos. Este patrón de herencia se explica porque los alelos están localizados en la región diferencial del cromosoma X, es decir, por ligamiento al X. Los genotipos se muestran en la Figura 2-15. El cruzamiento recíproco produce resultados diferentes. Un cruzamiento recíproco entre hembras de ojos blancos y machos de ojos rojos da lugar a una F_1 en la cual todas las hembras tienen ojos rojos y todos los machos tienen ojos blancos. La mitad de la F_2 está formada por moscas de ojos rojos y la otra mitad por moscas de ojos blancos, en ambos sexos. Por tanto, en el ligamiento al sexo, no sólo encontramos ejemplos de proporciones fenotípicas diferentes en los distintos sexos, sino también de diferencias entre los resultados de los cruzamientos recíprocos.

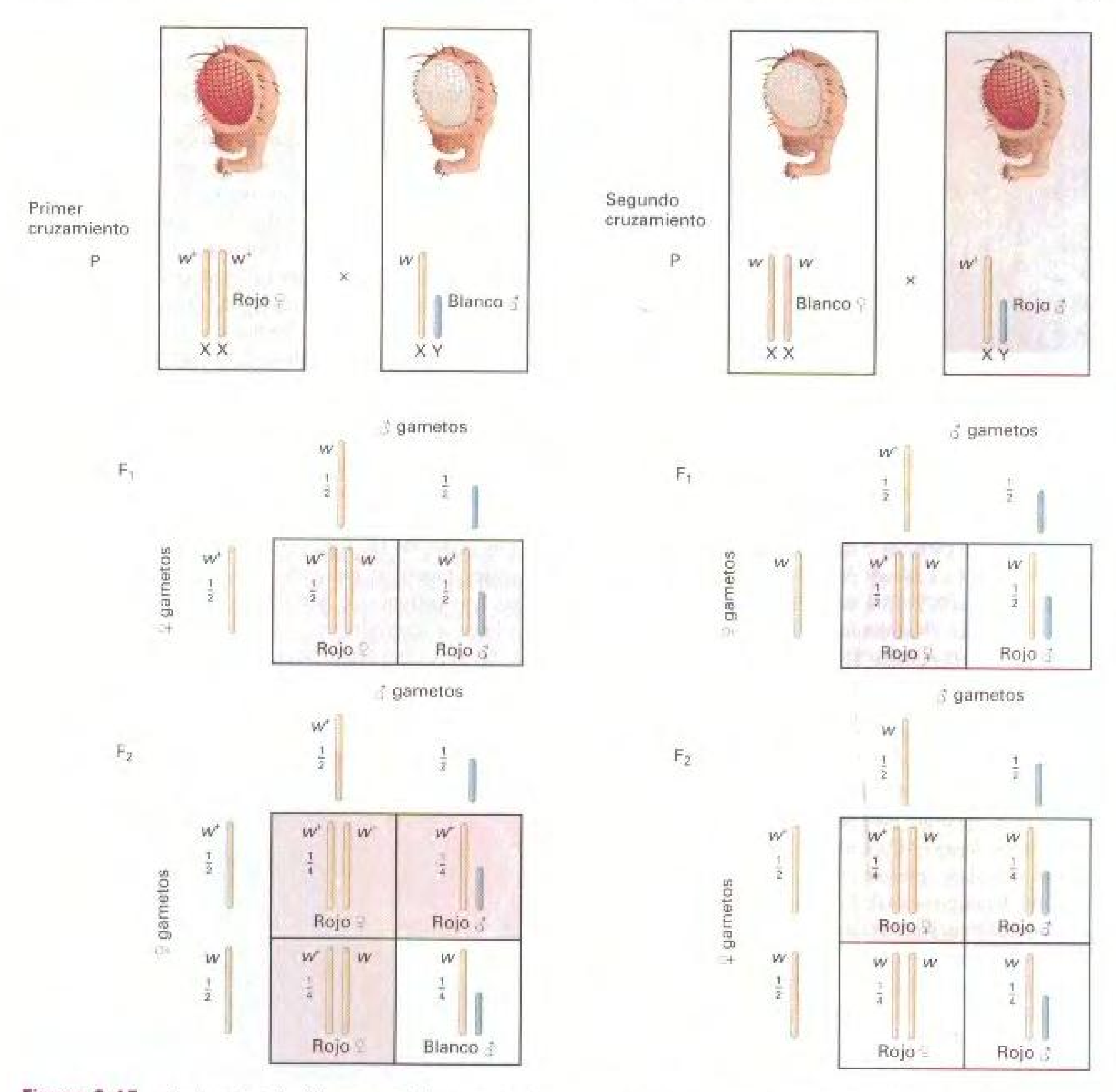


Figura 2-15. Explicación de los diferentes resultados que se obtienen en cruzamientos recíprocos entre ejemplares de *Drosophila* de ojos rojos (en la figura, «rojo») y de ojos blancos (en la figura, «blanco»). (En *Drosophila*, así como en otros sistemas experimentales, se utiliza el signo + en superíndice para denotar al alelo normal o silvestre. En este caso, w^+ = rojo y w = blanco.)

En *Drosophila*, el color de los ojos no tiene nada que ver con la determinación del sexo, con lo que vemos que los genes de los cromosomas sexuales no están necesariamente relacionados con la función sexual. Lo mismo ocurre en humanos, en donde los análisis de genealogías revelan la existencia de muchos genes ligados al sexo, de los cuales pocos tienen que ver con la función sexual.

COROLARIO

La herencia ligada al sexo muestra, de forma regular, diferentes proporciones fenotípicas en los dos sexos de la descendencia, así como diferentes proporciones en los cruzamientos recíprocos.

Genética humana

Los apareamientos humanos, como los de los organismos experimentales, muestran patrones de herencia del tipo descubierto por Mendel (herencia autosómica) y patrones de ligamiento al sexo. Como no se pueden realizar cruzamientos controlados en la especie humana, los genetistas deben recurrir al escrutinio de archivos familiares, con la esperanza de que se hayan producido cruzamientos informativos por azar. El escrutinio de archivos familiares se denomina **análisis de pedigríes** o **análisis de genealogías**. Un miembro de una familia que atrae la atención del genetista se llama ***propositus***. Normalmente, el fenotipo del *propositus* es raro en algún aspecto (por ejemplo, el *propositus* puede ser enano). El investigador sigue entonces el rastro del fenotipo en la historia familiar y dibuja un árbol genealógico, o **pedigrí**, empleando para ello los símbolos normalizados que se indican en la Figura 2-16.

Muchos pares de fenotipos humanos opuestos están determinados por parejas de alelos. Los patrones de herencia en los análisis de pedigríes pueden revelar dicha determinación alélica, pero las pistas que aporta el pedigrí han de ser interpretadas de modo diferente, dependiendo de si uno de los fenotipos opuestos es una enfermedad rara o si ambos fenotipos de un par son formas comunes (morfos) de un polimorfismo. Las enfermedades hereditarias raras (poco frecuentes) son competencia de la Genética médica.

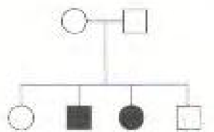
Genética médica

En el estudio de enfermedades poco comunes, pueden detectarse cuatro patrones generales de herencia por análisis de pedigríes: autosómicas recesivas, autosómicas dominantes, recesivas ligadas al cromosoma X y dominantes ligadas al cromoma X.

Enfermedades autosómicas recesivas. El fenotipo afectado de una enfermedad autosómica recesiva está determinado por un alelo recesivo, y el fenotipo no afectado está determinado por el correspondiente alelo dominante. Por ejemplo, la enfermedad humana fenilcetonuria (PKU) se hereda de forma mendeliana simple como un fenotipo recesivo, donde la PKU está determinada por el alelo p y la condición normal por P. Así, las personas que sufren la enfermedad serán de genotipo p/p y los no afectados, P/P o P/p. ¿Qué características de un pedigrí nos revelarían este tipo de herencia? Dos pistas clave son (1) que la enfermedad aparece generalmente entre la descendencia de padres no afectados, y (2) que los individuos afectados son indistintamente varones y mujeres. Cuando sabemos que las proporciones fenotípicas en varones y en mujeres son las mismas, podemos asumir que se trata de herencia mendeliana simple y no de herencia ligada al sexo. El siguiente pedigrí típico ilustra el aspecto clave de la aparición de hijos afectados de padres sanos.



Figura 2-16. Símbolos que se utilizan en el análisis de pedigríes humanos (Según W. F. Bodmer y L.L. Cavalli-Sforza, *Genetics, Evolution and Man*. Copyright © 1976 W. H. Freeman and Company.)



A partir de este árbol genealógico podemos deducir de forma inmediata que se trata de herencia mendeliana simple, siendo el alelo recesivo el responsable del fenotipo anormal (indicado con símbolos negros). Además, podemos deducir que ambos parentales son heterocigóticos, es decir, A/a; ambos deben llevar un alelo a, ya que cada uno de ellos ha transmitido este alelo a cada hijo enfermo, y deben llevar un alelo A porque ambos son fenotípicamente normales. Podemos asignar a los hijos (en el orden de la figura) los genotipos $A/-$, a/a, a/a y $A/-$. Así pues, el pedigrí puede representarse como:

A/a — A/a

$A/-$ a/a a/a $A/-$

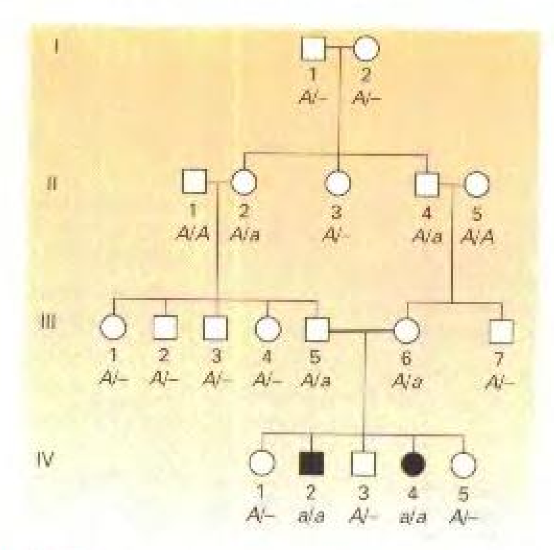


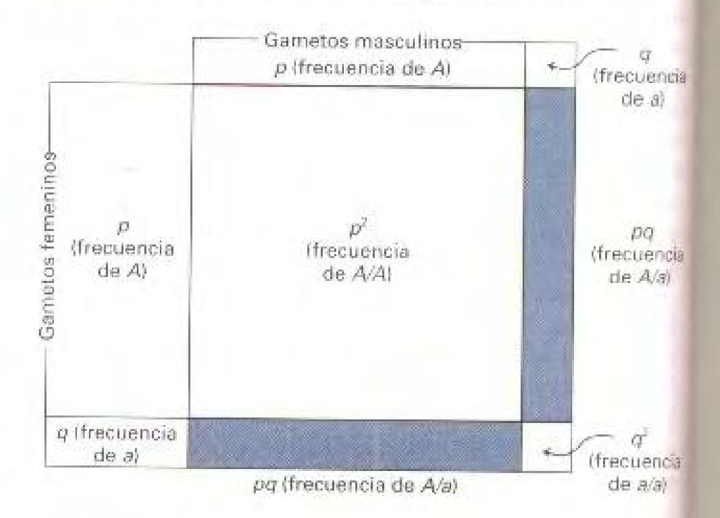
Figura 2-17. Pedigrí de un fenotipo recesivo poco común determinado por el alelo recesivo *a*. Normalmente, los pedigríes no incluyen los símbolos génicos, pero en este caso se han incluido los genotipos como referencia. Obsérvese que los individuos II-1 y II-5 se introducen en la familia desde fuera; se supone que son normales porque la condición hereditaria que se analiza es muy poco frecuente. Obsérvese también que no es posible estar seguro del genotipo de algunos individuos de fenotipo normal; tales individuos se indican como *A*/—.

Observe que este pedigrí no apoya la hipótesis de herencia recesiva ligada al cromosoma X, porque según esa hipótesis, una hija afectada debe tener una madre heterocigota (lo cual es posible) y un padre hemicigoto, lo que es claramente imposible, porque habría expresado el fenotipo de la enfermedad.

Observe otro aspecto interesante del análisis de pedigríes: aunque operen las reglas mendelianas, rara vez se observan en una familia las proporciones de Mendel, dado el escaso tamaño de la muestra. En el ejemplo anterior, observamos una proporción fenotípica 1:1 en la descendencia de un cruzamiento monohíbrido. Si la pareja hubiera tenido, por ejemplo, 20 hijos, la proporción habría sido algo parecido a 15 hijos sanos y 5 con PKU (una proporción 3:1), pero cualquier proporción es posible en una muestra de tan sólo cuatro hijos y, en general, puede encontrarse cualquier proporción.

Los pedigríes de enfermedades autosómicas recesivas aparecen con muchos símbolos claros y pocos símbolos negros. Una enfermedad recesiva aparece en grupos de hermanos, en tanto que los miembros de generaciones anteriores y posteriores no suelen estar afectados. Para entender por qué esto es así, es importante comprender ciertos aspectos de la estructura genética de las poblaciones en las que aparecen estas enfermedades poco comunes. Por definición, si la enfermedad es poco común, la mayor parte de las personas no son portadoras del alelo anormal. Además, la mayoría de las personas que sí llevan el alelo anormal son heterocigotas, más que homocigotas. La razón básica de que los heterocigotos sean más frecuentes que los homocigotos recesivos es que, para ser un homocigoto recesivo, ambos padres deben llevar el alelo *a*, pero para ser un heterocigoto, sólo uno de los padres debe llevar un alelo *a*.

Los genetistas cuentan con un sistema cuantitativo que les permite relacionar la rareza de un alelo recesivo con la alta o baja frecuencia de heterocigotos u homocigotos en la población. Para ello, se obtienen las frecuencias relativas de los genotipos en una población suponiendo que ésta se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, que será tratado en detalle en el Capítulo 24. De acuerdo con esta suposición simplificada, si las proporciones relativas de dos alelos *A* y *a* en una población son p y q, respectivamente, entonces las frecuencias de los tres posibles genotipos vienen determinadas por p^2 para *A*/*A*, $2pq$ para *A*/*a* y q^2 para *a*/*a*. Utilicemos un ejemplo numérico para ilustrar este concepto. Si suponemos que la frecuencia de un alelo recesivo q causante de una enfermedad es 1/50, entonces p es 49/50, la frecuencia de homocigotos con la enfermedad es $q^2 = (1/50)^2 = 1/250$ y la frecuencia de heterocigotos es $2pq = 2 \times 49/50 \times 1/50$, aproximadamente 1/25. Así, en este ejemplo vemos que los heterocigotos son aproximadamente 100 veces más frecuentes que los que sufren la enfermedad y esta relación aumenta cuanto más raro sea el alelo recesivo. La relación entre heterocigotos y homocigotos recesivos para un alelo poco común se muestra en el siguiente esquema. Observe que las frecuencias alélicas p y q pueden usarse como las frecuencias gaméticas en ambos sexos.



La aparición de un individuo afectado depende generalmente de la unión al azar de heterocigotos no emparentados. La consanguinidad (matrimonios entre parientes) incrementa la probabilidad de que el matrimonio sea entre dos heterocigotos. En la Figura 2-17 se muestra el caso de un matrimonio entre primos. Los individuos III-5 y III-6 son primos hermanos y tienen dos hijos homocigotos para el alelo poco frecuente. En la figura puede observarse que un ancestro heterocigoto puede dar lugar a muchos descendientes también heterocigoto. Así, dos primos pueden llevar el *mismo* alelo recesivo raro heredado de un antecesor común. Para que dos personas *no emparentadas* sean heterocigotas, deben haber heredado el alelo recesivo de *ambas* familias. Los matrimonios entre parientes acarrean pues un riesgo mucho mayor de producir fenotipos anormales por homocigosis de alelos recesivos que los matrimonios entre personas no emparentadas. Por esta razón, los matrimonios entre primos hermanos dan cuenta de una gran proporción de enfermedades recesivas en las poblaciones humanas.

¿Qué ejemplos hay de enfermedades humanas recesivas? La PKU ha servido anteriormente como ejemplo de análisis de pedigríes, pero ¿en qué consiste dicho fenotipo? La PKU es una enfer-

medad relacionada con el procesamiento del aminoácido fenilalanina, un componente de todas las proteínas que ingerimos como parte de nuestra dieta. La fenilalanina se convierte normalmente en tirosina por la acción de la enzima hidroxilasa de la fenilalanina:

$$\text{fenilalanina} \xrightarrow{\text{hidroxilasa de la fenilalanina}} \text{tirosina}$$

Sin embargo, si una mutación en el gen responsable de esta enzima altera su secuencia de aminoácidos cerca del centro activo, la enzima no puede unir ni transformar la fenilalanina (su sustrato). Por ello, la fenilalanina se acumula en el cuerpo y es convertida a su vez en ácido fenilpirúvico, un compuesto que interfiere con el desarrollo del sistema nervioso, lo que conduce a un retraso mental.

$$\text{fenilalanina} \xrightarrow[\times]{\text{hidroxilasa de la fenilalanina}} \text{tirosina}$$
$$\hookrightarrow \text{ácido fenilpirúvico}$$

Actualmente, los recién nacidos son examinados de forma rutinaria para detectar este fallo metabólico. Si se detecta el defecto, se disminuye la cantidad de fenilalanina consumida mediante una dieta especial, pudiendo detenerse el desarrollo de la enfermedad.

La fibrosis quística es otro ejemplo de enfermedad heredada según las reglas mendelianas como un fenotipo recesivo. El alelo que causa la enfermedad se aisló en 1989, pudiéndose determinar su secuencia de nucleótidos. Ello ha permitido entender la función del gen en personas afectadas y no afectadas, y abre la esperanza a un tratamiento más efectivo. La fibrosis quística es una enfermedad cuyo síntoma más importante es la secreción de una gran cantidad de mucosidad en los pulmones, lo que provoca la muerte por varias causas, aunque normalmente ésta se precipita por infección de las vías respiratorias superiores. La mucosidad puede extraerse por medio de agitadores mecánicos, y la infección pulmonar puede evitarse mediante el uso de antibióticos; por tanto, tratándose adecuadamente, los pacientes con fibrosis quística pueden vivir hasta la edad adulta. La fibrosis quística está causada por un defecto en una proteína que transporta iones cloruro a través de la membrana celular. La alteración del equilibrio salino resultante cambia la constitución de la mucosidad pulmonar.

El albinismo, que sirvió como modelo de la determinación alélica de fenotipos opuestos en el Capítulo 1, también se hereda de forma autosómica recesiva. La naturaleza molecular de un alelo causante de albinismo se esquematiza en la Figura 2-18. Este esquema muestra la herencia autosómica recesiva en un pedigrí, así como la naturaleza molecular de los alelos implicados. En este ejemplo, el alelo recesivo *a* está causado por un cambio en un par de bases que introduce un codón sin sentido (fin de traducción) en medio del gen, lo que da lugar a un polipéptido truncado. Por casualidad, la mutación también introduce una nueva diana para una enzima de restricción. Así, una sonda específica del gen detecta dos fragmentos en el caso de *a* y un solo fragmento en *A*. (Otros tipos de mutaciones producirían otros efectos al nivel detectado por los análisis Southern, Northern y Western).

En todos los ejemplos citados hasta el momento, la enfermedad está causada por un alelo que da lugar a una proteína defectuosa. En los heterocigotos, el único alelo funcional aporta una cantidad de proteína activa que resulta suficiente para las funciones celulares. Esta situación se conoce como haplosuficiencia.

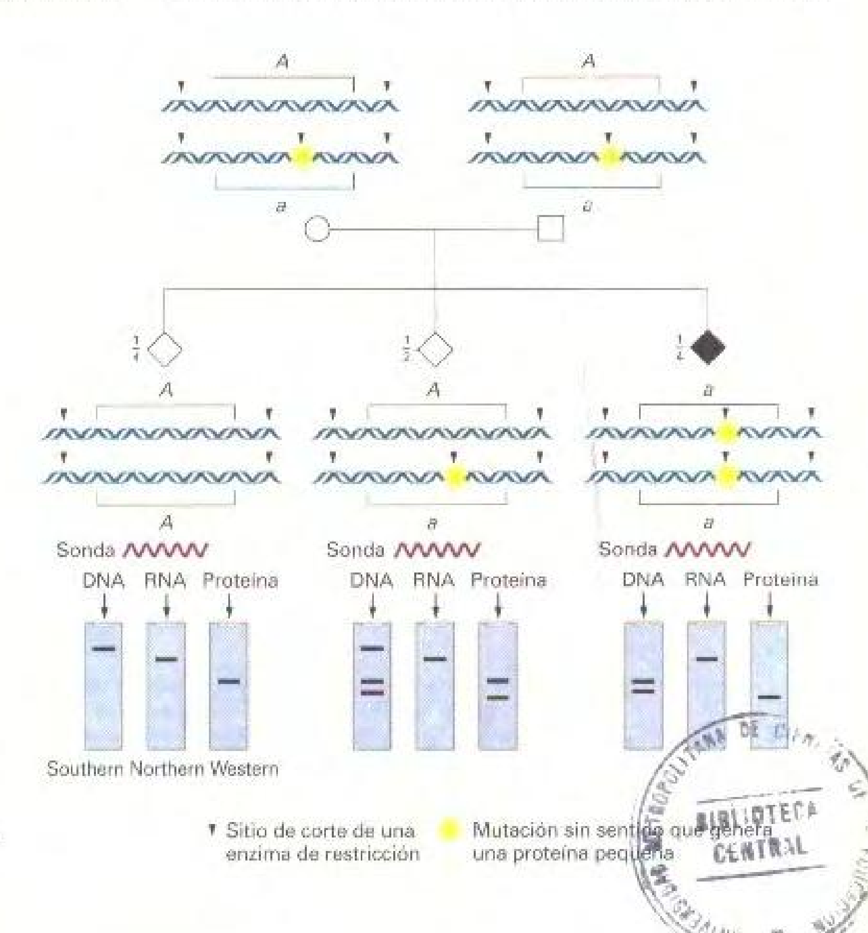


Figura 2-18. Base molecular de la herencia mendeliana en un pedigrí.



Figura 2-19. El fenotipo humano pseudoacondroplasia, ilustrado por una familia de cinc hermanas y dos hermanos. El fenotipo está determinad por un alelo dominante, que llamamos *D*, que entorpec el crecimiento óseo durante el desarrollo. La mayor parte de los miembros de la población humana puede representarse como *d/d* con respecto a este gen. Esta fotografía fue tomada a la llegada de la familia a Isra tras el final de la Segunda Guerra Mundial (UPI/Bettmann News Photos.)

COROLARIO

En los pedigríes, las enfermedades autosómicas recesivas se distinguen por la aparición del fenotipo en la descendencia masculina y femenina de individuos no afectados.

Enfermedades autosómicas dominantes. En las enfermedades autosómicas dominantes, el alelo normal es el recesivo y el anormal es el dominante. Podría parecer paradójico que una enfermedad poco frecuente pueda ser dominante, pero recuerde que dominancia y recesividad son simplemente un reflejo de cómo actúan los alelos, y que no se definen en función de su abundancia en la población. Un buen ejemplo de enfermedad dominante poco frecuente con herencia mendeliana es la pseudoacondroplasia, un tipo de enanismo (Fig. 2-19). En este caso, las personas de estatura normal son genotípicamente *d/d* y el fenot po enano puede ser, en principio, *D/d* o *D/D*. Sin embargo, s piensa que en los individuos *D/D* las dos «dosis» del alelo podrían producir un efecto tan grave que este genotipo es leta Si ello es cierto, todos los acondroplásicos son heterocigotos.

Al estudiar un pedigrí, las pistas más importantes para ident ficar una enfermedad dominante con herencia mendeliana so que el fenotipo enfermo tiende a aparecer en cada generación d pedigrí y que los padres y madres afectados transmiten el fenot po tanto a los hijos como a las hijas. De nuevo, la presencia d ambos sexos entre los descendientes afectados descarta el mod de herencia ligado al sexo. La enfermedad aparece en cada gene ración porque, normalmente, el alelo anormal presente en un i

I: 1 *A/a*, 2 *a/a*

II: 1 *a/a*, 2 *a/a*, 3 *a/a*, 4 *A/a*, 5 *a/a*, 6 *A/a*, 7 *a/a*

III: 1 *a/a*, 2 *a/a*, 3 *a/a*, 4 *a/a*, 5 *A/a*, 6 *a/a*, 7 *A/a*, 8 *a/a*, 9 *a/a*, 10 *a/a*, 11 *A/a*, 12 *a/a*, 13 *A/a*

Figura 2-20. Pedigrí de un fenotipo dominante determinado por un alelo dominante *A*. En este pedigrí se han deducido todos los genotipos.

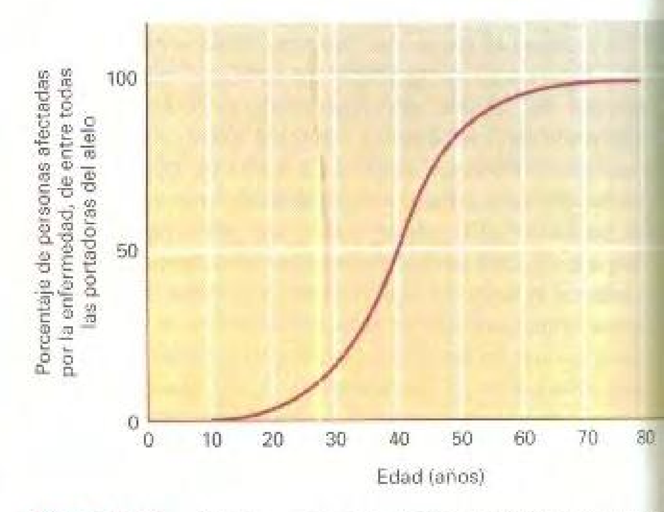


Figura 2-21. Edad de aparición de la enfermedad de Huntington. La grá muestra que las personas portadoras del alelo no muestran generalmente los síntomas de la enfermedad hasta que han superado la edad de tener hijos.

dividuo debe proceder de un ancestro de la generación anterior. Los alelos anormales también pueden surgir *de novo* por mutación. Esto es relativamente raro, pero tal posibilidad debe ser tenida en cuenta. Un pedigrí típico de una enfermedad dominante se muestra en la Figura 2-20. Advierta, una vez más, que las proporciones mendelianas no se observan necesariamente en las familias. Como ocurre con las enfermedades recesivas, los individuos poseedores de una copia del alelo raro (*A*/*a*) son mucho más frecuentes que los que poseen dos copias (*A*/*A*), de modo que la mayoría de los afectados son heterocigotos, y prácticamente todos los emparejamientos en los que está implicada una enfermedad dominante son del tipo *A*/*a* × *a*/*a*. Por tanto, cuando se computan globalmente los descendientes de muchos de estos matrimonios, se espera una proporción 1:1 entre individuos no afectados (*a*/*a*) y afectados (*A*/*a*).

La enfermedad de Huntington es un ejemplo de enfermedad heredada como un fenotipo dominante que está determinado por un alelo de un solo gen. El fenotipo consiste en una degenera-

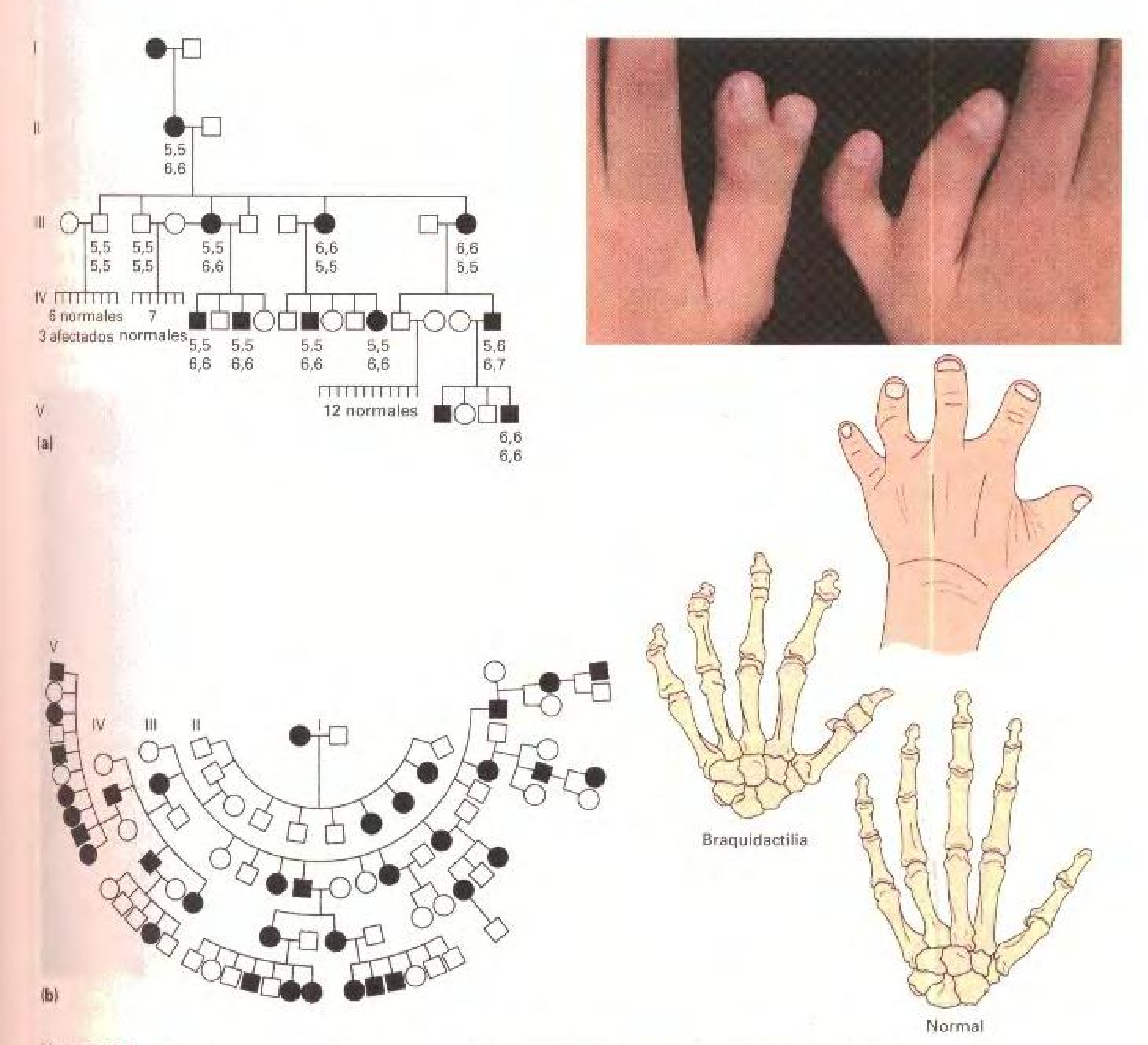
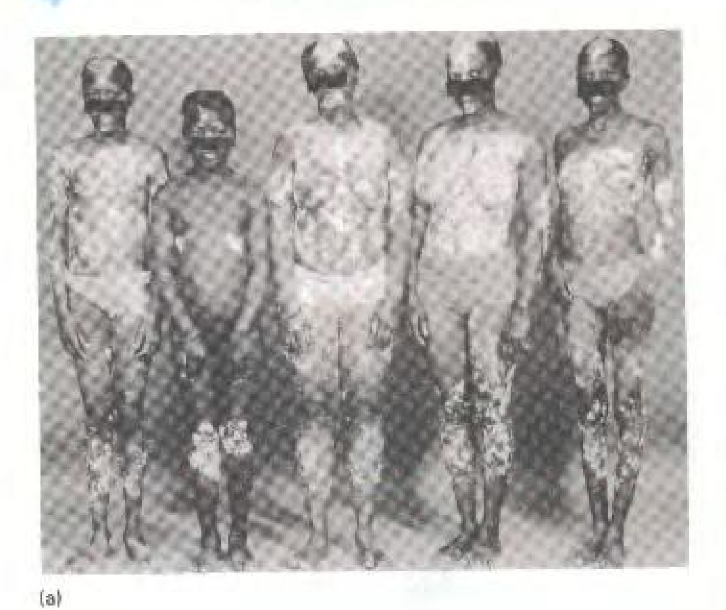
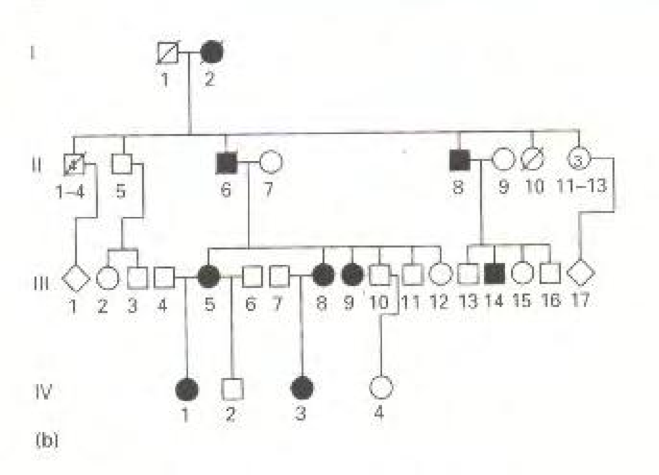


Figura 2-22. Algunos fenotipos raros de manos humanas. (a) (*derecha*) Polidactilia, fenotipo dominante caracterizado por la presencia de dedos extras en pies, manos o ambos, determinado por el alelo *P*. En el pedigrí que se acompaña (*izquierda*), se indica el número de dedos de las manos en la línea superior, y el de dedos de los pies en la línea inferior. (Obsérvese la variabilidad de la expresión del alelo *P*, tema que veremos en detalle en el Cap. 4.) (b) (*derecha*) Braquidactilia, fenotipo dominante de dedos cortos, determinado por el alelo *B*. Obsérvese los huesos terminales de los dedos de la mano, muy cortos en comparación con los dedos de una mano normal. El pedigrí de una familia con braquidactilia muestra un patrón de herencia típico de una enfermedad dominante poco frecuente. Todos los individuos afectados son *B*/*b*, y los no afectados son *b*/*b*. (Parte a, foto © Biophoto Associates/Science Source; parte b, basado en C. Stern, *Principles of Human Genetics*, 3.ª ed., Copyright © 1973, W. H. Freeman and Company.)

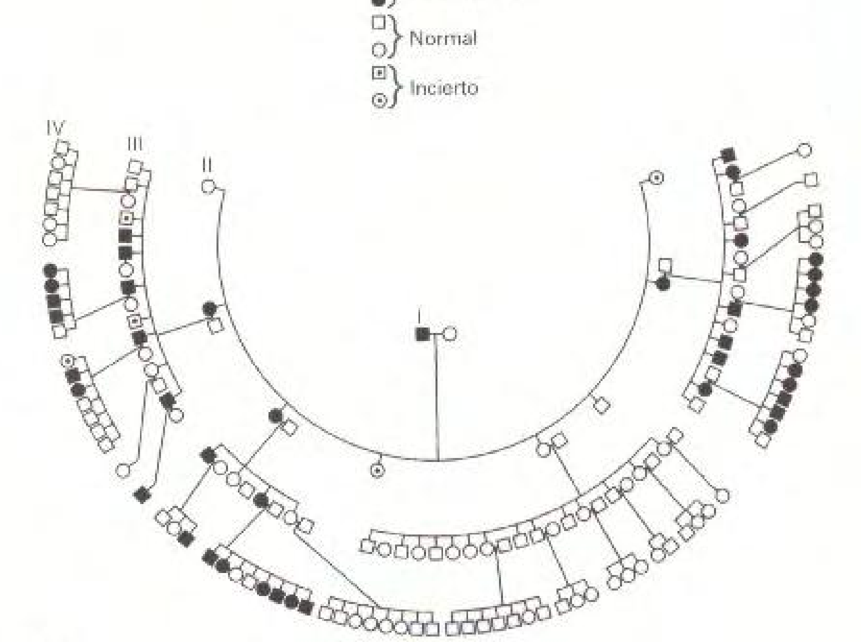



(a)



(b)

Piebaldismo
Normal
Incierto



(c)



(d)

Figura 2-23. Piebaldismo, raro fenotipo humano dominante. Aunque el fenotipo se encuentra esporádicamente en todas las razas, sus detalles característicos se observan mejor en las personas de piel oscura. (a) Las fotografías muestran la vista de frente y de espalda de los individuos afectados IV-1, IV-3, III-5, III-8 y III-9 del pedigrí familiar que aparece en (b). Observe la variación de la expresión del gen del piebaldismo entre los miembros de la familia. (c) Un pedigrí más numeroso, de una familia noruega. Se cree que esta enfermedad se debe a un alelo dominante que interfiere con la migración de los melanocitos (las células productoras de melanina) desde la superficie dorsal a la ventral, durante el desarrollo. Particularmente característica es la mancha blanca en la frente, a menudo acompañada de un mechón de cabello blanco. La misma condición básica se conoce en ratones (d), en los que, de nuevo, los melanocitos dejan de cubrir la parte superior de la cabeza y la superficie ventral.

El piebaldismo no es una forma de albinismo; las células de las manchas blancas poseen el potencial genético para fabricar melanina, pero como no son melanocitos, no están programadas para hacerlo. En el albinismo verdadero, las células carecen del potencial para fabricar melanina. (El DNA del alelo del piebaldismo ha sido identificado recientemente como un alelo del gen *c-kit*, un tipo de gen conocido como protooncogén.) (Partes a y b de I. Winship, K. Young, R. Martell, R. Ramesar, D. Curtis y P. Beighton, «Piebaldism: An Autonomous Autosomal Dominant Entity», *Clinical Genetics*, 39, 1991, 330; parte c de C. Stern, *Principles of Human Genetics*, 3.ª ed. Copyright © 1973, W. H. Freeman and Company; parte d de R. A. Fleischman, University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas — véase también R. A. Fleischman, D. L. Saltman, V. Stastny y S. Zneimer, «Deletion of the *c-kit* Protooncogene in the Human Development Defect Piebald Trait», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1991, 10 885.)

ción neuronal que provoca convulsiones y muerte prematura. Sin embargo, es una enfermedad de manifestación tardía, no apareciendo generalmente los síntomas hasta después de que los individuos hayan comenzado a tener descendencia (Fig. 2-21). Cada hijo de un portador del alelo anormal tiene una probabilidad de un 50 % de heredar dicho alelo y la enfermedad asociada al mismo. Esta trágica situación ha llevado a realizar grandes esfuerzos para identificar a las personas portadoras del alelo anormal antes de que aparezcan los primeros síntomas de la enfermedad. La aplicación de técnicas moleculares ha dado como resultado un procedimiento de escrutinio muy prometedor.

Otras condiciones dominantes poco frecuentes son la polidactilia (mayor número de dedos) y la braquidactilia (dedos cortos), mostradas en la Figura 2-22, y un fenotipo de piel moteada, mostrado en la Figura 2-23, conocido como piebaldismo.

COROLARIO

En los pedigríes de enfermedades autosómicas dominantes mendelianas aparecen en cada generación tanto varones afectados como mujeres afectadas, ocurriendo también que varones y mujeres afectados transmiten la enfermedad en igual proporción a sus hijos e hijas.

Enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X. Los fenotipos que muestran herencia recesiva ligada al X muestran típicamente los siguientes patrones en los pedigríes:

1. Muchos más varones que mujeres muestran el fenotipo a analizar. Ello se debe a que una mujer sólo puede estar afectada si tanto su padre como su madre son portadores del alelo (por ejemplo, $X^A/X^a \times X^a/Y$) mientras que para que un varón presente el fenotipo sólo es necesario que la madre sea portadora del alelo correspondiente. Si el alelo recesivo es muy poco frecuente, casi todos los individuos que presenten el fenotipo serán varones.

2. Ningún descendiente de un varón afectado estará afectado, pero todas sus hijas resultan ser «portadoras» del alelo recesivo que queda enmascarado por su condición heterocigótica. La mitad de los hijos varones de estas portadoras estarán afectados (Fig. 2-24). Observe que en fenotipos *frecuentes* ligados al cromosoma X, este patrón quedará oscurecido por el hecho de que el alelo recesivo puede heredarse tanto de una madre heterocigota como del padre.

3. Ninguno de los hijos de un varón afectado mostrará el fenotipo en estudio, ni transmitirá el fenotipo a su descendencia. La razón de esta ausencia de transmisión varón-varón es que un hijo varón obtiene su cromosoma Y del padre, por lo que normalmente no heredará también el cromosoma X de éste.

En el análisis de pedigríes de alelos poco frecuentes ligados al cromosoma X, se supone que una mujer normal de genotipo desconocido es homocigota a menos que haya pruebas en contra de ello.

Quizás el ejemplo más conocido de herencia recesiva ligada al cromosoma X sea el de la ceguera a los colores verde y rojo. Las personas con esta enfermedad son incapaces de distinguir el rojo y el verde, y ven ambos colores como uno solo. Los genes para la visión del color han sido caracterizados a nivel molecular. La visión del color se basa en la presencia en la retina de tres tipos diferentes de células llamadas conos, cada uno de los cuales es sensible a luz de longitudes de onda del color rojo, del verde o del azul. Los determinantes genéticos de los conos sensibles al rojo y al verde están en el cromosoma X. Como ocurre con otros fenotipos recesivos ligados al cromosoma X, hay muchos más varones que mujeres con este fenotipo.

Otro ejemplo que nos resulta familiar es el de la *hemofilia*, un fallo en la coagulación de la sangre. Para que la sangre coagule,

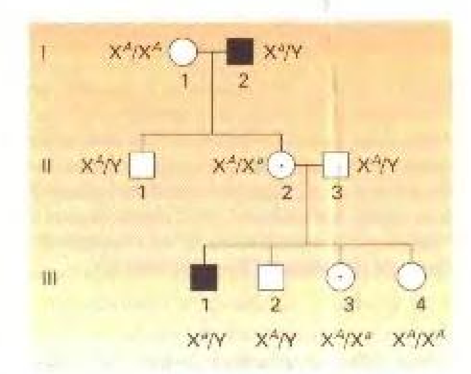
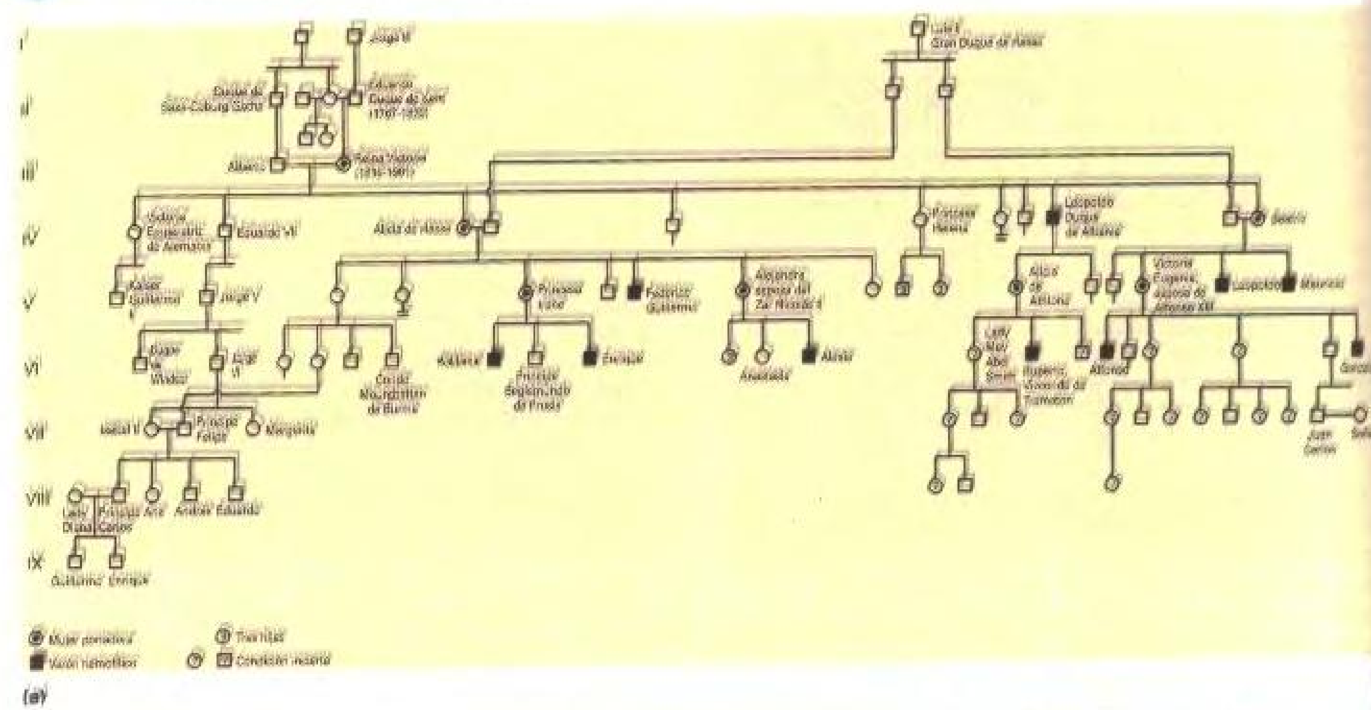


Figura 2-24. Pedigrí que ilustra cómo los alelos recesivos ligados al X se manifiestan en los varones y son portados por sus hijas en la siguiente generación sin que se exprese en ellas, para expresarse de nuevo en sus hijos varones. Observe que III-3 y III-4 no se distinguen fenotípicamente.




(b)

Figura 2-25. Transmisión de la hemofilia, una condición recesiva ligada al cromosoma X, en varias familias reales europeas. Un alelo recesivo causante de la hemofilia (fallo en la coagulación de la sangre) apareció en las células reproductoras de la Reina Victoria, o uno de sus padres, por mutación. Este alelo se extendió a otras familias reales por matrimonios entre ellos. (a) Este pedigrí parcial muestra varones afectados y mujeres portadoras (heterocigotas). Para mayor claridad, se han omitido la mayoría de los familiares que entraron en el pedigrí por casamiento. ¿Puede predecir la probabilidad de que el alelo recesivo siga presente en algún miembro de la familia real británica? (b) El cuadro muestra a la Reina Victoria rodeada por sus numerosos descendientes. (Parte a, según C. Stern, *Principles of Human Genetics*, 3.ª ed. Copyright © 1973 W.H. Freeman and Company; parte b, Royal Collection, St. James's Palace. Copyright Her Majesty Queen Elizabeth II.)

muchas proteínas deben interactuar de una forma secuencial. El tipo más frecuente de hemofilia se debe a la ausencia o mal funcionamiento de una de estas proteínas, denominada *Factor VIII*. Los casos más conocidos de hemofilia se encuentran en el pedigrí de varias familias reales europeas emparentadas (Fig. 2-25). El alelo original de la hemofilia de este pedigrí apareció espon-táneamente (por mutación) en las células reproductoras de lo[s] padres de la Reina Victoria o bien en ella misma. Alexis, hijo de[l] último zar de Rusia, heredó el alelo de la Reina Victoria, que er[a] abuela de su madre, Alejandra. Hoy día, la hemofilia puede se[r]

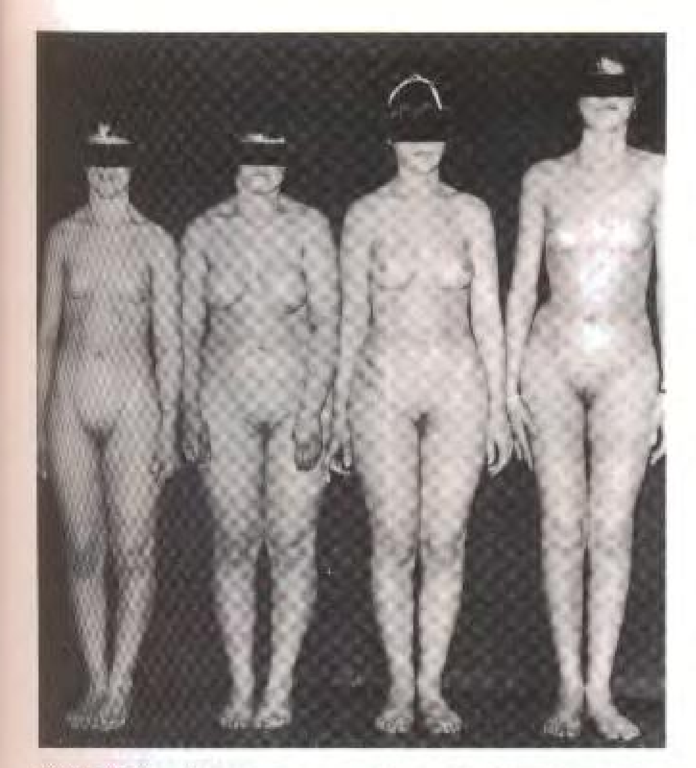


Figura 2-26. Cuatro hermanos con síndrome de feminización testicular (insensibilidad congénita a los andrógenos). Los cuatro individuos de la fotografía tienen 44 autosomas más un cromosoma X y otro Y, pero todos han heredado el alelo recesivo ligado al X que confiere insensibilidad a los andrógenos (hormonas masculinas). Una de sus hermanas (no mostrada) era portadora XX y tuvo un hijo que también desarrolló el síndrome de feminización testicular. (Leonard Pinsky, McGill University.)

tratada médicamente, pero hubo un tiempo en que era potencialmente mortal. Es interesante hacer notar que en el Talmud judío se dictan reglas para admitir excepciones a la norma obligatoria de circuncidar a los varones, reglas que muestran claramente que la forma de transmisión de la enfermedad a través de mujeres portadoras no afectadas era bien conocida en la antigüedad. Por ejemplo, un varón recién nacido quedaba exento de la circuncisión si los hijos de alguna hermana de su madre habían sangrado profusamente durante la circuncisión.

La *distrofia muscular de Duchenne* es una enfermedad mortal, ligada al X y recesiva. El fenotipo consiste en debilitamiento y atrofia de los músculos. Generalmente, la enfermedad comienza a manifestarse antes de los seis años, obliga al uso de silla de ruedas a los doce y suele provocar la muerte a los veinte. El gen responsable de la distrofia muscular de Duchenne ha sido ya

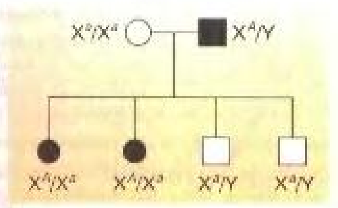


Figura 2-27. Pedigrí que muestra que todas las hijas de un varón que expresa un fenotipo dominante ligado al X también presentarán el fenotipo.

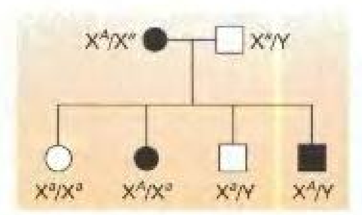


Figura 2-28. Pedigrí que muestra que todas las hembras afectadas por una condición dominante ligada al X son normalmente heterocigotas, que transmitirán la condición a la mitad de sus hijos y sus hijas.

aislado y se sabe que determina una proteína muscular, la distrofina. Este descubrimiento abre nuevas esperanzas para un mayor entendimiento de la fisiología de esta enfermedad y, en última instancia, para su tratamiento.

Un fenotipo recesivo y ligado al X, poco frecuente, y que resulta interesante desde el punto de vista de la determinación del sexo es el conocido como *síndrome de feminización testicular*, cuya frecuencia es de alrededor de 1 de cada 65 000 varones. Las personas que sufren de este síndrome son cromosómicamente varones, con 44 autosomas más un X y un Y, pero se desarrollan como mujeres (Fig. 2-26). Presentan genitales externos femeninos, una vagina ciega y carecen de útero. Pueden aparecer testículos, situados en los labios de los genitales o en el abdomen. Aunque muchas de estas personas están felizmente casadas, son por supuesto estériles. Este síndrome no revierte mediante tratamiento con hormonas masculinas (andrógenos) por lo que se la denomina en ocasiones *síndrome de insensibilidad a andrógenos*. La razón de esta insensibilidad es que el receptor de andrógenos no es funcional, de modo que la hormona masculina no puede tener efecto sobre los órganos diana implicados en la masculinidad. En la especie humana se genera feminidad cuando no funciona el sistema determinante de la masculinidad.

Enfermedades dominantes ligadas al cromosoma X. Éstas muestran las siguientes características:

1. Los varones afectados transmiten la condición a todas sus hijas y no lo hacen a ninguno de sus hijos varones (Fig. 2-27).
2. Las mujeres heterocigotas afectadas casadas con varones sanos transmiten el defecto a la mitad de sus hijos, tanto varones como hembras (Fig. 2-28).

En humanos se conocen pocos casos de fenotipos dominantes ligados al X. Uno de ellos es la *hipofosfatemia*, un tipo de raquitismo resistente al tratamiento con vitamina D.

Inactivación del cromosoma X

En un estado temprano del desarrollo de las hembras de mamífero, uno de los cromosomas X de cada célula es inactivado. El cromosoma X inactivado se condensa mucho y se hace visible como un cuerpo que se tiñe intensamente y que se conoce como el **corpúsculo de Barr** (Fig. 2-29). Sorprendentemente, el estado inactivo persiste a lo largo de todas las divisiones mitóticas subsiguientes que dan lugar al cuerpo adulto del animal. El proceso de inactivación ocurre al azar, afectando a cualquiera de los cromosomas X. Como consecuencia de esta inactivación, el cuer-

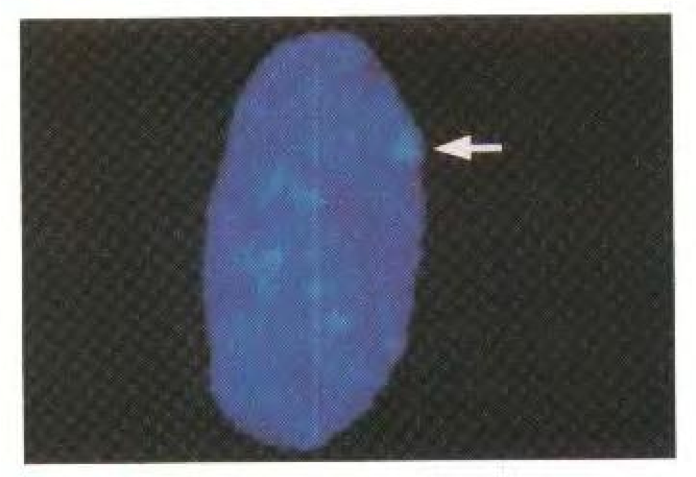


Figura 2-29. Un corpúsculo de Barr, cromosoma X condensado e inactivado, en el núcleo de una célula de una mujer normal. Los hombres no tienen corpúsculos de Barr. El número de estos corpúsculos que aparecen en una célula es siempre igual al número total de cromosomas X menos uno. (Karen Dyer Montgomery.)



Figura 2-31. Gata calicó. Tanto las gatas calicó como las gatas carey son heterocigotas para dos alelos, *O* (naranja) y *o* (negro), de un gen que contro[la] el color del pelaje. Las manchas de color naranja y negro se deben a la inactivación del cromosoma X. Las manchas blancas se deben a un determinant[e] genético distinto, presente en las gatas calicó, pero no en las gatas carey. (Anthony Griffiths.)

po adulto de la hembra es una mezcla, o **mosaico**, de células con cualquiera de los dos genotipos posibles respecto al cromosoma X (Fig. 2-30). Durante el crecimiento y el desarrollo de los tejidos, las células descendientes por mitosis de una célula progenitora permanecen a menudo cercanas unas a otras, de forma que si una hembra es heterocigota para un gen que se expresa en dicho tejido y que está ligado al X, los dos alelos del heterocigoto se manifies-tan en forma de sectores o parches. Un fenotipo en mosaico que nos resulta familiar es el patrón de pigmentación del pelaje de las gatas carey y calicó (Fig. 2-31). Se trata de hembras heteroci-

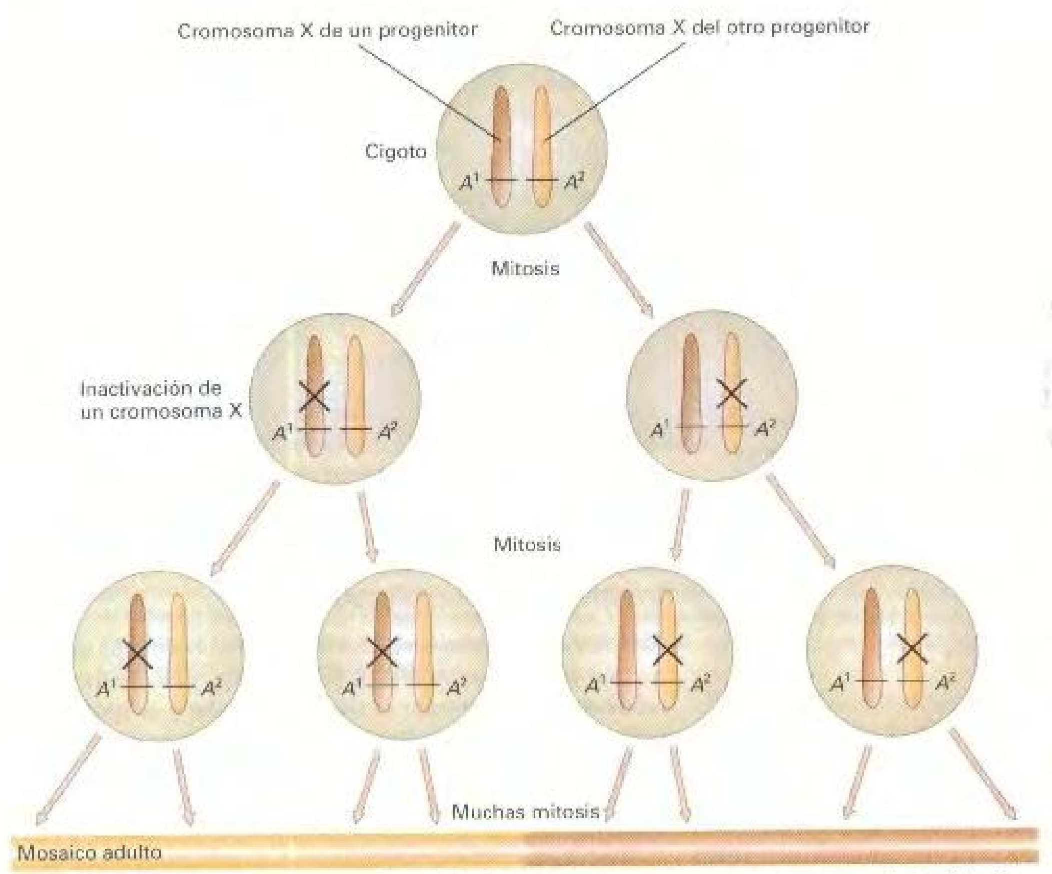


Figura 2-30. Inactivación del cromosoma X en los mamíferos. El cigoto de una hembra de mamífero heterocigota para un gen ligado al X da lugar a un adulto mosaico, compuesto por dos líneas celulares que expresan uno u otro de los alelos del gen heterocigota, porque uno u otro de los cromosomas X se inactiva en todas las líneas celulares. Para mayor claridad, la inactivación se muestra en el estado de dos células, pero puede tener lugar en otros estados del desarrollo también de escaso número de células.

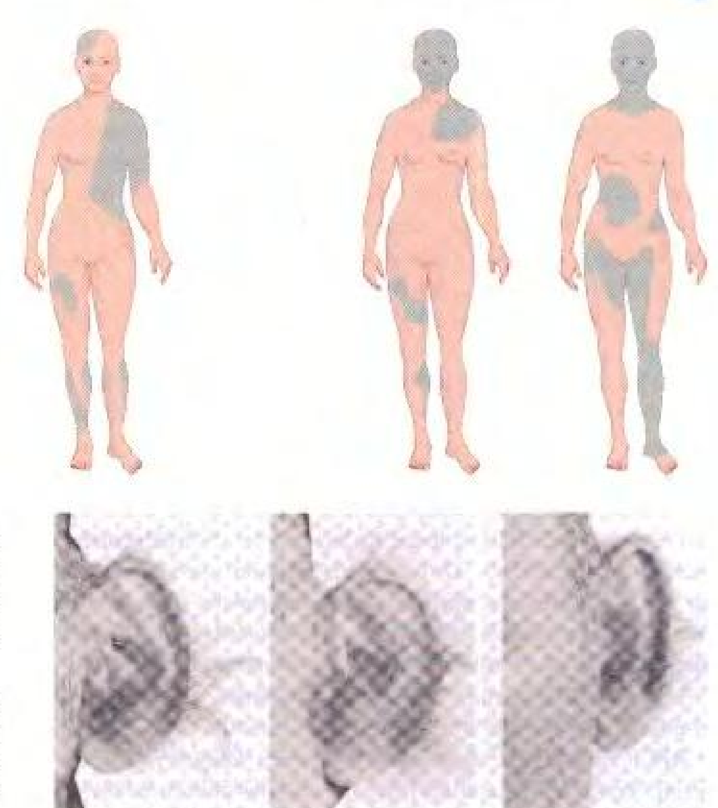



Figura 2-32. Mosaicismo somático en tres generaciones de mujeres heterocigotas para la displasia ectodérmica anhidrótica, síndrome ligado al sexo consistente en la ausencia de glándulas sudoríparas. Las zonas sin estas glándulas se muestran de color verde. La extensión y localización de los diferentes tejidos se debe al azar, pero todas las mujeres muestran el característico patrón de mosaico.

Figura 2-33. Borde de la oreja peludo. Se ha propuesto que este fenotipo puede deberse a un alelo de un gen ligado al Y. (Tomado de C. Stern, W. R. Centerwall y S. S. Sarkar, *The American Journal of Human Genetics*, 16, 1964, 467. Reproducido con permiso de Grune & Stratton, Inc.)

gotas para los alelos *O* (que determina pelaje de color naranja) y *o* (que determina pelaje de color negro). La inactivación del cromosoma portador de *O* produce un parche negro que expresa *o*, mientras que la inactivación del cromosoma portador de *o* produce un parche naranja que expresa el alelo *O*.

Aunque todas las mujeres tienen un cromosoma X inactivado en cada una de sus células, la inactivación sólo se manifiesta si la mujer es heterocigota para un gen ligado al X. Ello es particularmente notable si, como en las gatas carey, el fenotipo se manifiesta en la parte exterior del cuerpo. Tal es el caso de la enfermedad conocida como *displasia ectodérmica anhidrótica*. Los varones portadores del alelo responsable (llamémosle *d*) en estado hemicigótico carecen de glándulas sudoríparas. Una mujer heterocigota (*D*/*d*) es un mosaico de sectores D y d esparcidos por todo el cuerpo, como se muestra en la Figura 2-32.

Curiosamente, la hipótesis de que el gen que produce el síndrome de feminización testicular está localizado en el cromosoma X se confirmó cuando se demostró al microscopio que la mitad de los fibroblastos de mujeres heterocigóticas para el gen podían unir andrógenos, pero no la otra mitad. Es conveniente hacer notar que la inactivación del cromosoma X se suprime en el tejido germinal femenino, de manera que ambos cromosomas X se transmiten a los óvulos.

Herencia ligada al Y

Los genes de la región diferencial del cromosoma Y humano son heredados sólo por los varones, siendo transmitida la región de padres a hijos varones. El gen ***TDF*** desempeña un papel primordial en la determinación de la masculinidad, ya que es responsable de la síntesis del **factor determinante de los testículos**. El gen *TDF* ha sido localizado en la región diferencial del cromosoma Y (véase el Capítulo 23). Sin embargo, aparte de la propia masculinidad, no se ha demostrado rotundamente el ligamiento al Y de ningún fenotipo humano. Como posibilidad, se ha propuesto la presencia de pelos en el borde de la oreja (Fig. 2-33). Este fenotipo es extraordinariamente raro en las poblaciones de la mayoría de los países, pero es más frecuente en las poblaciones de la India. Un genetista indio, K. Dronamraju, estudió el fenotipo en su propia familia. Todos los varones de la familia descendientes de un mismo antepasado varón mostraban dicho carácter. En otras familias indias, sin embargo, los varones parecen transmitir el fenotipo sólo a algunos de sus hijos varones, lo cual ha hecho que las pruebas de ligamiento al Y no se consideren concluyentes.

Polimorfismos autosómicos humanos

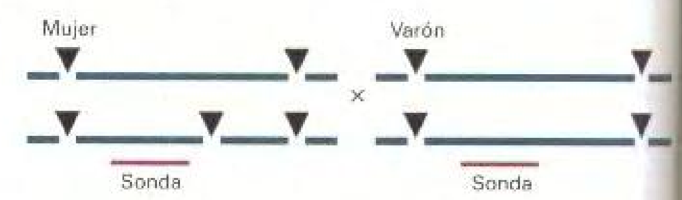
En el Capítulo 1 se explicó que un polimorfismo es la coexistencia en una población de dos o varios fenotipos *comunes* de un carácter. Los fenotipos alternativos de un polimorfismo se heredan a menudo como alelos de un solo gen. En la especie humana hay muchos ejemplos. Considere, por ejemplo, los siguientes dimorfismos: ojos azules u ojos marrones, pelo oscuro o pelo rubio, presencia o ausencia de hoyuelos en la barbilla, presencia o ausencia del «pico de viuda» y lóbulos de la oreja separados o pegados a la mejilla.

La interpretación de los pedigríes de dimorfismos es diferente de la realizada para el caso de las enfermedades raras porque, por definición, ambas formas de un dimorfismo son frecuentes. Analicemos un pedigrí de un dimorfismo humano interesante. La mayoría de las poblaciones humanas son dimórficas para la capacidad de percibir el sabor del compuesto feniltiocarbamida (PTC). Ello significa que las personas pueden, bien detectarlo como un sabor amargo desagradable o, para gran sorpresa e incredulidad de éstos, no percibirlo en absoluto. En el pedigrí de la Figura 2-34 podemos observar que dos «perceptores» pueden tener hijos no perceptores. Esto indica claramente que el alelo responsable de la capacidad para percibir el sabor es dominante, y que el alelo para

el carácter no perceptor es recesivo. Observe, sin embargo, que casi todas las personas que se introducen en esta familia portan el alelo recesivo, bien en heterocigosis o bien en homocigosis. Tal pedigrí difiere, por tanto, de los que incluyen anomalías recesivas raras, para las cuales se asume normalmente que todos los individuos que entran en la familia son homocigotos normales. Como ambos alelos PTC son frecuentes, no es sorprendente que todos los miembros de la familia menos uno estén casados con portadores de al menos una copia del alelo recesivo.

El polimorfismo constituye un fenómeno genético muy interesante. Los genetistas de poblaciones han quedado sorprendidos al descubrir el alto grado de polimorfismo que hay, generalmente, en las poblaciones naturales de plantas y animales. Además, aunque la genética de los polimorfismos es sencilla, hay muy pocos polimorfismos para los que exista una explicación satisfactoria sobre la coexistencia de los morfos. Pero el polimorfismo está muy extendido a todos los niveles del análisis genético, incluso a nivel de DNA. De hecho, los polimorfismos observados en el DNA han sido muy valiosos como puntos de referencia (marcas) que ayudan a los genetistas a encontrar su camino en la exploración de los cromosomas de los organismos complejos.

Un tipo útil de marca molecular cromosómica, o marcador, es el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, o RFLP (del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Vimos en el Capítulo 1 que las enzimas de restricción son enzimas bacterianas que cortan el DNA en secuencias específicas del genoma. Las secuencias dianas no tienen significado biológico en organismos distintos a las bacterias —ocurren por puro azar—. Aunque, generalmente, las dianas de restricción aparecen consistentemente en sitios específicos, algunas veces un sitio concreto está ausente en uno de los dos cromosomas, o aparece un sitio extra en uno de ellos. Si tal diana de restricción (ausente o presente) flanquea una secuencia con la que hibrida una sonda, la hibridación tipo Southern dará como resultado un polimorfismo o RFLP. Considere este ejemplo sencillo de un cruzamiento en el que un cromosoma de uno de los progenitores contiene una diana extra que no aparece en los otros cromosomas de ese tipo:



La hibridación Southern mostrará dos bandas en la mujer y una sola en el varón. Los fragmentos «heterocigóticos» se heredarán exactamente igual que un gen. Podríamos escribir el cruzamiento anterior como:

largo/corto	×	largo/largo
y los descendientes serán	$\frac{1}{2}$	largo/corto
	$\frac{1}{2}$	largo/largo

de acuerdo con la ley de la segregación igualitaria.

COROLARIO

Las poblaciones de plantas y animales (incluyendo la especie humana) son muy polimórficas. Los morfos opuestos están generalmente determinados por alelos que se heredan con un patrón mendeliano simple.

El trabajo de Mendel ha resistido el paso del tiempo y nos ha proporcionado el trabajo preliminar básico para todos los estudios de Genética moderna. Fue la primera persona que prestó atención a la regularidad matemática de los patrones hereditarios. A partir de estos patrones fue capaz de realizar deducciones sobre la naturaleza fundamental de la herencia. Los genetistas actuales siguen utilizando hoy día la misma estrategia que empleó Mendel. Y, aún así, su trabajo permaneció sin ser reconocido y fue rechazado hasta 35 años después de su publicación. ¿Por qué? Hay muchas razones posibles, pero aquí consideraremos sólo una. Quizás fue así porque la ciencia biológica de aquel tiempo no supo aportar pruebas sobre la existencia de ninguna unidad física real en las células que pudiera corresponderse con las partículas genéticas de Mendel. Los cromosomas no habían sido estudiados todavía, la meiosis no había sido descrita e, incluso, se desconocían los detalles sobre el ciclo de vida de las plantas. Sin este conocimiento básico, podría haber parecido que las ideas de Mendel constituían meros juegos matemáticos.

Sobre la puerta de entrada del Museo de Mendel, en Brno, hay una frase melancólica escrita por Mendel en checo: «MÁ DOBA PRIJDE», que significa «Mi tiempo llegará». El tiempo de Mendel llegó; durante el siglo XX florecieron la investigación y el entendimiento de la herencia, como resultado de los estudios seminales de Mendel realizados en el diminuto jardín de un monasterio. Sus «factores» hipotéticos (genes, como los llamamos actualmente) son una realidad molecular bien entendida, e incluso se están caracterizando genomas completos. Es posible comenzar con las últimas investigaciones sobre clonación, terapia génica, seres transgénicos, el proyecto genoma humano y muchos otros, y rastrear hacia el pasado a lo largo de la literatura hasta llegar a aquel único artículo titulado «Experimentos de hibridación de plantas», presentado en 1865 ante la Sociedad de Historia Natural de Brünn

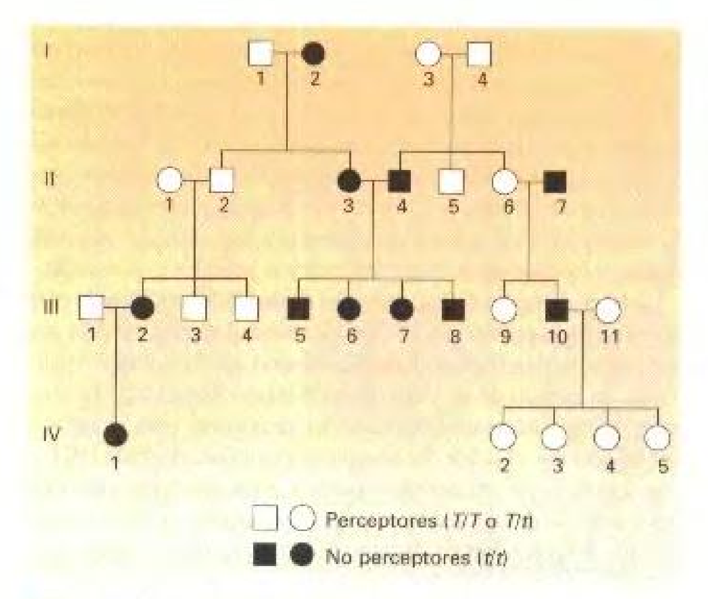


Figura 2-34. Pedigrí para la capacidad de percibir el sabor del compuesto químico PTC.

RESUMEN

La Genética moderna se basa en el concepto de gen, la unidad fundamental de la herencia. Como resultado de sus experimentos con guisantes de jardín, Mendel fue el primero en reconocer la existencia de los genes. Por ejemplo, cruzando una línea pura de plantas de guisante de jardín de flores púrpuras con otra de flores blancas, y permitiendo la autopolinización de la generación F_1, que era completamente púrpura, Mendel consiguió una generación F_2 de plantas con una proporción 3:1 de flores púrpuras y blancas. En cruzamientos como el anterior, pero realizados con plantas de semillas amarillas y verdes, descubrió que existe una proporción 1:2:1 que subyace a todas las proporciones 3:1. A partir de estas proporciones matemáticas exactas, Mendel concluyó que existen determinantes hereditarios de naturaleza particulada, conocidos actualmente como genes. En las células de las plantas superiores y de los animales, los genes aparecen en parejas. Las distintas formas de un gen se denominan alelos. Los pares génicos pueden ser idénticos (homocigóticos) o estar formados por alelos diferentes (heterocigóticos). Un alelo puede ser dominante, por ejemplo *Y* (amarillo), o recesivo, por ejemplo *y* (verde). La dominancia se define por el fenotipo expresado en el heterocigoto.

En un cruzamiento entre plantas heterocigóticas amarillas (*Y/y*) y plantas homocigóticas recesivas verdes (*y/y*), se obtiene una proporción 1:1 de plantas amarillas y verdes. A partir de esta proporción, Mendel confirmó la llamada primera Ley, que establece que durante la formación de los gametos, los dos alelos de un gen se separan uno de otro y segregan a un mismo número de gametos. Por tanto, cada gameto lleva un solo alelo de cada gen. La unión de los gametos para formar un cigoto ocurre al azar, con independencia del alelo que lleve cada uno. La ley de la segregación igualitaria se basa en la segregación de los cromosomas homólogos en la primera división de la meiosis. Se ha demostrado que esta ley es aplicable a todos los organismos que experimentan divisiones meióticas.

Las conclusiones anteriores provienen del trabajo de Mendel con cruzamientos monohíbridos. En los cruzamientos dihíbridos, Mendel encontró proporciones 9:3:3:1 en la F_2, que corresponden en realidad a dos proporciones 3:1 combinadas aleatoriamente. A partir de estas proporciones, Mendel infirió que los alelos de los dos genes estudiados en un cruzamiento dihíbrido se comportan de forma independiente. Este concepto constituye la segunda Ley de Mendel, que es generalmente aplicable a genes situados en cromosomas diferentes. La base de la ley es la segregación independiente de los cromosomas no homólogos durante la meiosis.

En muchos organismos, el sexo está determinado por cromosomas especiales denominados cromosomas sexuales. Se encuentran ejemplos en *Drosophila*, en la especie humana y en ciertas plantas dioicas. Los genes de los cromosomas sexuales muestran patrones de herencia diferentes a los mostrados por los genes de los autosomas, que muestran patrones mendelianos estrictos. En ciertos cruzamientos, aparecen proporciones fenotípicas distintas en los dos sexos de la descendencia. Además, en ciertos cruzamientos recíprocos de los dos mismos fenotipos opuestos, aparecen diferencias en las proporciones de la descendencia.

La Genética mendeliana tiene una gran trascendencia para los seres humanos. Muchas enfermedades están determinadas por alelos anormales, recesivos o dominantes, de genes autosómicos. Estos alelos se heredan de forma estrictamente mendeliana. Otras enfermedades muestran, claramente, herencia ligada al sexo. Todos estos patrones hereditarios pueden deducirse mediante el análisis de pedigríes utilizando ciertas reglas normalizadas. Los morfos de los dimorfismos humanos también se heredan siguiendo los patrones mendelianos.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

segregación independiente / genotipo / fenotipo / dihíbrido / cruzamiento de prueba / proporción 9:3:3:1 / autocruzamiento / gametos / fecundación / proporción 1:1:1:1

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

Cada capítulo incluye un problema resuelto que pone especial énfasis en la integración de conceptos de diferentes capítulos. El aprendizaje de cualquier disciplina es un proceso lineal, en el que se va avanzando de tema en tema con cierto orden. Pero la propia disciplina no es lineal. Es, más bien, una serie de partes integradas que el profesional ve en su conjunto. Esperamos que el énfasis en la integración clarificará la estructura general de la Genética, y que el lector no verá los contenidos de cada capítulo de manera aislada. Al ir pasando de un capítulo a otro, los niveles de comprensión se sustentan sobre los precedentes y la materia se ensambla como las capas de una cebolla.

♦ Problema ♦

Se han realizado cruzamientos entre dos líneas puras de conejos, que llamaremos A y B. Un macho de la línea A se cruzó con una hembra de la línea B, y los conejos de la F_1 se cruzaron entre sí para producir la F_2. Se descubrió que $\frac{3}{4}$ de los animales de la F_2 acumulaban grasa subcutánea blanca y $\frac{1}{4}$ la acumulaba de color amarillo. Más tarde se examinaron los animales de la F_1 y se descubrió que acumulaban grasa blanca. Varios años más tarde, se intentó repetir el experimento usando el mismo macho de la línea A y la misma hembra de la línea B. Esta vez, la F_1 y toda la

F_2 (22 animales) acumularon grasa blanca. La única diferencia que parecía relevante entre el experimento original y el segundo era que, en el original, a todos los animales se les alimentó con verduras frescas, mientras que en el segundo, fueron alimentados con pienso comercial para conejos. Ofrezca una explicación para la diferencia entre ambos experimentos y algún tipo de ensayo que ponga a prueba su idea.

♦ Solución ♦

La primera vez que se realizó el experimento, los criadores podían, justificadamente, proponer que una pareja de alelos determinaba la presencia de grasa corporal blanca o amarilla, porque los datos se asemejan claramente a los resultados de Mendel con el guisante. El color blanco debe ser dominante, de modo que podemos representar al alelo blanco como *B* y al amarillo como *b*. Los resultados pueden representarse así:

P	$B/B \times b/b$
F_1	B/b
F_2	$\frac{1}{4}$ B/B
	$\frac{1}{2}$ B/b
	$\frac{1}{4}$ b/b

Sin duda, si los conejos parentales hubieran sido sacrificados, habríamos predicho que uno de ellos (no sabríamos cuál) tenía grasa blanca y el otro, amarilla. Afortunadamente, esto no se hizo, y los mismos animales pudieron cruzarse otra vez, lo cual llevó a un resultado diferente y muy interesante. A menudo, en ciencia, una observación inesperada puede llevar a un principio novedoso y, en lugar de dedicarse a otra cosa, resulta más útil tratar de explicar la inconsistencia observada. Así que, ¿por qué desapareció la proporción 3:1? He aquí algunas explicaciones posibles.

En primer lugar, quizás los genotipos de los animales parentales habían cambiado. Este tipo de cambio espontáneo que afecta al animal completo, o al menos a sus gónadas, es muy poco probable, porque incluso la experiencia común nos dice que los organismos tienden a ser muy estables en sus características.

En segundo lugar, en la muestra de 22 animales F_2 de la repetición no había conejos con grasa amarilla simplemente por casualidad («mala suerte»). Esto también parece poco probable, porque la muestra era bastante grande, pero es una posibilidad definida.

Una tercera posibilidad se refiere al concepto tratado en el Capítulo 1 de que los genes no actúan en el vacío: su acción depende del medio ambiente. De ahí proviene la típica frase «genotipo más ambiente igual a fenotipo». Un corolario de este lema es que los genes pueden actuar de distinta forma en diferentes ambientes, así que

Genotipo 1 más ambiente 1 igual a fenotipo 1

y

Genotipo 1 más ambiente 2 igual a fenotipo 2

En la cuestión que nos ocupa, las diferentes dietas constituyen diferentes ambientes, de modo que una posible explicación de los resultados es que el alelo recesivo *b* sólo produce grasa amarilla cuando la dieta contiene verduras frescas. Esta explicación puede ser comprobada. Un modo de hacerlo es repetir otra vez el experimento alimentando a los animales con verduras frescas, pero los padres podrían haber muerto para entonces. Un modo más conveniente sería cruzar entre sí varios de los conejos de la F_2 con grasa blanca obtenidos en el segundo experimento. De acuerdo con la interpretación original, alrededor de $\frac{2}{3}$ deben llevar al menos un alelo recesivo *b* para la grasa amarilla, y si sus descendientes son alimentados con verduras, el color amarillo debería aparecer en proporciones mendelianas. Por ejemplo, si elegimos dos conejos, *B/b* y *b/b*, la descendencia debería ser $\frac{1}{2}$ con grasa blanca y $\frac{1}{2}$ con grasa amarilla.

Si ello no ocurre y no aparecen descendientes de grasa amarilla en ninguno de los cruzamientos con los conejos de la F_2, estaríamos forzados a volver a la primera o la segunda explicación. La segunda explicación puede ser sometida a prueba observando un número mayor de individuos, y si esta explicación tampoco prueba ser satisfactoria, sólo nos queda la primera, difícil de comprobar experimentalmente.

Como probablemente ya haya adivinado, en realidad la dieta era la culpable. Los detalles concretos ilustran admirablemente los efectos del medio ambiente. Las verduras frescas contienen sustancias amarillas denominadas xantofilas y el alelo dominante *B* confiere a los conejos la capacidad de transformar esas sustancias en un compuesto incoloro («blanco»). Sin embargo, los animales *b/b* carecen de esa capacidad y las xantofilas se depositan en la grasa, que se torna amarilla. Si no se ingieren xantofilas, tanto los animales *B/–* como los *b/b* acaban acumulando grasa blanca.

PROBLEMAS RESUELTOS

Esta sección de cada capítulo contiene algunos problemas resueltos que muestran cómo enfocar las series de problemas que se presentan a continuación. El propósito de las series de problemas es poner a prueba su comprensión de los principios genéticos aprendidos en el capítulo. El mejor modo de demostrar la comprensión de un tema es ser capaz de utilizar ese conocimiento en una situación real o simulada. Tenga en cuenta que no existe una forma automática de resolver los problemas. Las tres armas más importantes a su disposición son los principios genéticos que acaba de aprender, el sentido común y el ensayo y error.

Antes de empezar, damos algunos consejos generales. En primer lugar, es absolutamente esencial que lea y entienda el problema completo. Encuentre exactamente qué datos se suministran, qué presunciones debe hacer, qué pistas se dan en el problema y qué inferencias pueden hacerse a partir de la información disponible. En segundo lugar, sea metódico. Quedarse contemplando la pregunta rara vez ayuda a responderla. Reorganice los datos a su manera, preferiblemente usando un diagrama o un esquema que le ayude a elaborar su respuesta. Buena suerte.

1. Considere tres guisantes amarillos y lisos, denominados A, B y C. A partir de cada uno se obtiene una planta que se cruza con otra derivada de un guisante verde y rugoso. De cada cruzamiento se observan exactamente 100 guisantes, que se agrupan en las siguientes clases fenotípicas:

A:	51 amarillos, lisos 49 verdes, lisos
B:	100 amarillos, lisos
C:	24 amarillos, lisos 26 amarillos, rugosos 25 verdes, lisos 25 verdes, rugosos

¿Cuáles eran los genotipos de A, B y C? (utilice símbolos de su elección, cuidando de definir bien cada uno de ellos)

♦ Solución ♦

Observe que cada uno de los cruzamientos es

amarillo liso × verde rugoso
↓
descendencia

Puesto que A, B y C se cruzaron con la misma planta, las diferencias entre las tres poblaciones de descendientes deben atribuirse a diferencias entre los genotipos de A, B y C.

Debería recordar muchas cosas del capítulo sobre estos análisis. Esto está bien, pero veamos qué podemos deducir a partir de los datos. ¿Qué hay acerca de la dominancia? El cruzamiento clave para descubrirla es el B. En este caso, el patrón de herencia es

amarillo liso × verde rugoso
↓
todos amarillos lisos

Por tanto, los fenotipos amarillo y liso deben ser los dominantes, ya que la dominancia se define literalmente según el fenotipo del híbrido. Sabemos ahora que el parental verde y rugoso empleado en todos los cruzamientos debe ser un homocigoto completo; ello es muy conveniente porque significa que cada cruzamiento corresponde a un cruzamiento de prueba, que normalmente es el más informativo.

Volviendo a la descendencia de A, vemos una proporción 1:1 de amarillos y verdes. Esta proporción constituye una demostración de la primera ley de Mendel (la segregación igualitaria) e indica que para el carácter del color, el cruzamiento debe haberse producido entre un heterocigoto y un homocigoto recesivo. Si A = amarillo y a = verde, tenemos:

$$A/a \times a/a$$
↓
$\frac{1}{2}$ A/a (amarillo)
$\frac{1}{2}$ a/a (verde)

Para el carácter de la forma, el cruzamiento debe haber sido homocigoto dominante × homocigoto recesivo, ya que toda la descendencia es lisa. Si L = liso y l = rugoso, tenemos

$$L/L \times l/l$$
↓
L/l (liso)

Combinando los dos caracteres, tenemos

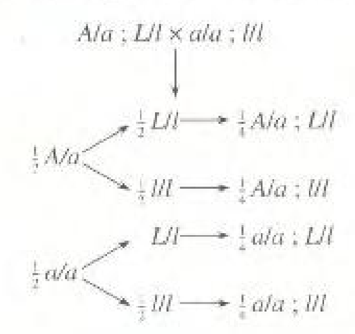
$$A/a\ ;\ L/L \times a/a\ ;\ l/l$$
↓
$\frac{1}{2}$ $A/a\ ;\ L/l$
$\frac{1}{2}$ $a/a\ ;\ L/l$

Ahora el cruzamiento B resulta muy claro, y debe haber sido:

$$A/A\ ;\ L/L \times a/a\ ;\ l/l$$
↓
$A/a\ ;\ L/l$

ya que cualquier heterocigosis en el guisante B habría dado lugar a varios fenotipos descendientes, no sólo uno.

¿Qué hay sobre C? En este caso, observamos una proporción de 50 amarillos:50 verdes (1:1) y una proporción de 49 lisos:51 rugosos (también 1:1). Por tanto, ambos genes del guisante C debían estar en heterocigosis, siendo el cruzamiento C:



que es una buena demostración de la segunda Ley de Mendel (comportamiento independiente de genes distintos).

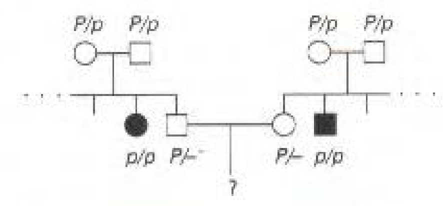
¿Cómo habría analizado un genetista estos cruzamientos? Esencialmente de la misma forma en que acabamos de hacerlo, pero con menos pasos intermedios. Posiblemente, algo como esto: «amarillo y liso, dominantes; segregación de un solo gen en A; B homocigótico dominante; segregación independiente de dos genes en C».

2. La fenilcetonuria (PKU) es una enfermedad hereditaria humana producida por la incapacidad del organismo para metabolizar el compuesto fenilalanina, contenido en las proteínas que ingerimos. La PKU se manifiesta durante la infancia temprana y, si no se trata adecuadamente, provoca generalmente retraso mental. La PKU se debe a un alelo recesivo que muestra herencia mendeliana simple.

Una pareja desea tener hijos y acude a un especialista para obtener consejo genético, porque el hombre tiene una hermana con PKU y la mujer tiene un hermano con PKU. No se conocen otros casos de PKU en sus familias. La pareja le pide al genetista que determine la probabilidad de que su primer hijo tenga PKU. ¿Cuál es esta probabilidad?

♦ Solución ♦

¿Qué podemos deducir a partir de estos datos? Si llamamos p al alelo causante de la enfermedad y P al correspondiente alelo normal, entonces la hermana del varón y el hermano de la mujer deben ser p/p. Para que esto ocurra los cuatro abuelos debían ser heterocigotos normales. El pedigrí puede resumirse de esta forma:



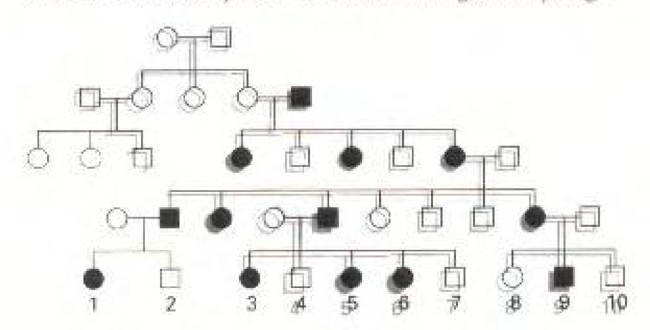
Hechas estas inferencias, la resolución del problema se reduce a la aplicación de la regla del producto. La única forma de que la pareja pueda tener un hijo con PKU es que ambos sean heterocigotos (es obvio que ellos mismos no sufren la enfermedad). Los matrimonios de los abuelos pueden ser considerados como simples cruzamientos monohíbridos mendelianos, de los cuales se esperan las siguientes proporciones de descendientes:

$$\left.\begin{array}{l}\frac{1}{4}\ P/P \\ \frac{1}{2}\ P/p\end{array}\right\}\ \text{Normales}\ (\tfrac{3}{4})$$
$$\frac{1}{4}\ p/p \quad \text{PKU}\ (\tfrac{1}{4})$$

Sabemos que el varón y la mujer son normales, de forma que cada uno tiene una probabilidad de 2/3 de ser heterocigótico porque en la clase de individuos normales $P/-$, 2/3 son P/p y 1/3 son P/P.

La probabilidad de que *tanto* la mujer como el hombre sean heterocigotos es $\frac{2}{3} \times \frac{2}{3} = \frac{4}{9}$. Si ambos son heterocigotos, un cuarto de sus hijos podría tener PKU, por lo cual, la probabilidad de que el primer hijo tenga PKU es $\frac{1}{4}$, y la probabilidad de que la pareja sea heterocigota y que el primer hijo tenga PKU es $\frac{4}{9} \times \frac{1}{4} = \frac{4}{36} = \frac{1}{9}$. Ésta es la respuesta del problema.

3. Una enfermedad humana poco frecuente afecta a una familia de la forma en que se muestra en el siguiente pedigrí:



a. Deduzca el modo de herencia más probable.

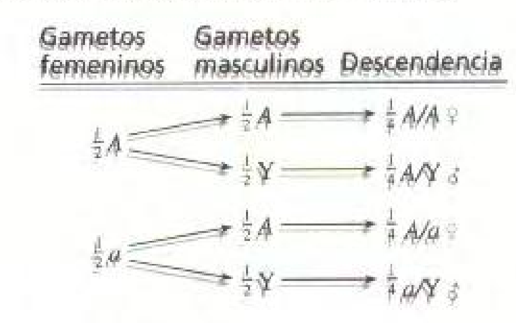
b. ¿Cuáles serían las consecuencias de los matrimonios entre los primos 1 × 9, 1 × 4, 2 × 3 y 2 × 8?

♦ Solución ♦

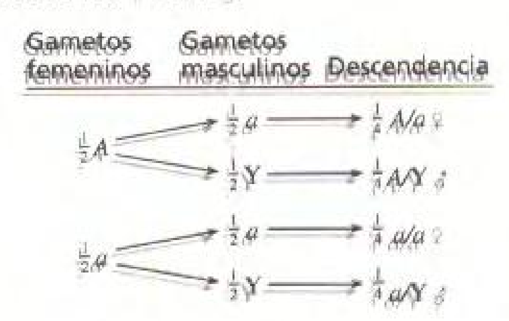
a. Lo más probable es que se trate de herencia dominante ligada al cromosoma X. Suponemos que el fenotipo de la enfermedad es dominante porque, tras haber sido introducido en la familia por el varón de la generación II, aparece en todas las generaciones. Suponemos que el fenotipo está ligado al cromosoma X porque los padres (varones) no transmiten la enfermedad a sus hijos varones. Si fuera autosómico dominante, sería normal la transmisión de padres a hijos varones.

En teoría, podría ser autosómica recesiva, pero no es probable. Observe, en particular, los matrimonios entre miembros afectados de la familia y personas sanas que «entran» a ella desde fuera. Si la enfermedad fuera autosómica recesiva, la única forma de que tuvieran hijos afectados es que todas las personas que «entran» en la familia fueran heterocigotas; en ese caso, los matrimonios serían a/a (afectado) × A/a (no afectado). Sin embargo, hemos dicho que la enfermedad es poco frecuente. En ese caso, es muy improbable que los heterocigotos sean tan comunes. Un modo de herencia recesiva ligada al X sería imposible, porque en un matrimonio entre una mujer afectada y un varón normal no aparecerían hijas afectadas. Así, representaremos al alelo causante de la enfermedad como A mientras que a representará al alelo normal.

b. 1 × 9: La mujer número 1 debe ser heterocigota A/a porque debe haber obtenido a de su madre normal. El número 9 debe ser A/Y. Por tanto, el cruzamiento es A/a ♀ × A/Y ♂.



1 × 4 debe ser A/a ♀ × a/Y ♂.



2 × 3 debe ser a/Y ♂ × A/a ♀ (igual que 1 × 4).

2 × 8 debe ser a/Y ♂ × a/a ♀ (todos los descendientes normales).

PROBLEMAS

Los problemas sencillos están generalmente al principio de la serie. Aquellos de especial dificultad están señalados con un asterisco.

1. ¿Cuáles son las leyes de Mendel?

2. Si tuviera una mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) de fenotipo A, ¿cómo comprobaría si es *A/A* o *A/a*?

3. Se han emparejado dos conejillos de indias de color negro y, a lo largo de varios años, han tenido 29 descendientes negros y 9 blancos. Explique este resultado, indicando los genotipos de los parentales y de los descendientes.

4. Observe el diagrama de Punnett de la Figura 2-10.

   a. ¿Cuántos genotipos hay en los 16 compartimientos de la cuadrícula?

   b. ¿Cuál es la proporción genotípica que subyace a la proporción fenotípica 9:3:3:1?

   c. ¿Puede idear una fórmula simple que le permita calcular el número de genotipos de la descendencia de cruzamientos dihíbridos, trihíbridos, etc.? Repítalo para los fenotipos.

   d. Mendel predijo que, en todas las clases fenotípicas del diagrama de Punnett, excepto en una, habría varios genotipos diferentes. En particular, llevó a cabo muchos cruzamientos para identificar los varios genotipos subyacentes al fenotipo amarillo y liso. Muestre dos modos diferentes de llevar a cabo dicha identificación (recuerde que todos los guisantes amarillos y lisos tienen la misma apariencia).

5. Tiene tres dados: uno rojo (R), uno verde (V) y otro azul (A). Si tira los tres dados a la vez, calcule la probabilidad de obtener los siguientes resultados:

   a. 6(R) 6(V) 6(A)

   b. 6(R) 5(V) 6 (A)

   c. 6(R) 5(V) 4(A)

   d. ningún seis

   e. dos seises y un cinco en cualquier dado

   f. tres seises o tres cincos

   g. el mismo número en todos los dados

   h. un número diferente en cada dado

6. Tiene tres botes con canicas, como se indica a continuación:

bote 1	600 rojas	y	400 blancas
bote 2	900 azules	y	100 blancas
bote 3	10 verdes	y	990 blancas

   a. Si toma una canica de cada bote, a ciegas, calcule la probabilidad de obtener

   (1) una roja, una azul y una verde
   (2) tres blancas
   (3) una roja, una verde y una blanca
   (4) una roja y dos blancas
   (5) una coloreada y dos blancas
   (6) al menos una blanca

   ***b.** En cierta planta, *R* = rojo y *r* = blanco. Con el propósito de obtener una blanca, autopoliniza una planta heterocigótica roja *R/r*. ¿Cuál es el número mínimo de semillas que debe cultivar para tener una seguridad de un 95 % de obtener al menos una planta blanca? [**Una pista:** considere su respuesta a la parte a(6)].

   c. Cuando a una mujer se le inyecta un óvulo fecundado *in vitro*, la probabilidad de que éste se implante con éxito es del 20 %. Si a una mujer se le inyectan simultáneamente cinco óvulos fecundados, ¿cuál es la probabilidad de que quede embarazada? (Parte c de Margaret Holm)

7. **a.** La capacidad para percibir el sabor del compuesto feniltiocarbamida es un fenotipo autosómico dominante, y la incapacidad para percibirlo, recesivo. Si una mujer perceptora cuyo padre es no perceptor se casa con un varón perceptor que, en un matrimonio previo, había tenido una hija no perceptora, ¿cuál es la probabilidad de que su primer hijo sea

   (1) una niña no perceptora?
   (2) una niña perceptora?
   (3) un niño varón perceptor?

   b. ¿Cuál es la probabilidad de que sus dos primeros hijos (de cualquier sexo) sean perceptores?

8. Juan y Marta están planeando tener hijos, pero el hermano de Juan tiene galactosemia (una enfermedad autosómica recesiva) y la abuela de Marta también la sufrió. Una hermana de Marta tiene tres hijos, ninguno de los cuales sufre galactosemia. ¿Cuál es la probabilidad de que el primer hijo de Juan y Marta sufra la enfermedad?

El problema paso a paso

En algunos capítulos, ampliamos uno de los problemas con una lista de ejercicios que ayuda a procesar mentalmente los principios y conocimientos relativos al tema del problema. Puede hacer ejercicios parecidos con otros problemas.

Antes de intentar encontrar la solución del problema 8, considere algunas de las preguntas que se exponen a continuación, cuya única intención es la de servir de ejemplo.

1. ¿Puede plantearse el problema utilizando un pedigrí? Si es así, represente uno.

2. ¿Pueden volver a plantearse algunas partes del problema utilizando diagramas de Punnett?

3. ¿Pueden volver a plantearse algunas partes del problema utilizando esquemas ramificados?

4. Identifique en el pedigrí algún matrimonio que ilustre la primera Ley de Mendel.

5. Defina todos los términos científicos del problema, y consulte los términos sobre los que no esté seguro.

6. ¿Qué suposiciones deben hacerse para responder al problema?

7. ¿Qué miembros de la familia que no han sido mencionados deben ser considerados? ¿Por qué?

8. ¿Qué reglas estadísticas son importantes, y en qué situaciones pueden aplicarse? ¿Se presentan dichas situaciones en el problema?

9. Indique dos generalizaciones sobre enfermedades recesivas en la población humana.

10. En general, ¿cuál es la importancia de la rareza de un fenotipo a estudiar por medio de análisis de pedigríes, y qué puede inferirse en este problema?

11. En esta familia, ¿qué genotipos son seguros y cuáles no lo son?

12. ¿En qué sentido difieren las familias de Juan y Marta? ¿Cómo afecta esto a sus cálculos?

13. ¿Hay alguna información irrelevante en el enunciado del problema?

14. ¿En qué sentido es similar o difiere este problema de los otros que ha resuelto satisfactoriamente?

15. ¿Puede forjar una historia basada en el dilema de este problema?

Ahora intente resolver el problema. Si es incapaz de hacerlo, intente encontrar el obstáculo y escriba una frase o dos que describan su dificultad. Vuelva entonces a las preguntas planteadas anteriormente y vea si alguna de ellas se relaciona con su dificultad.

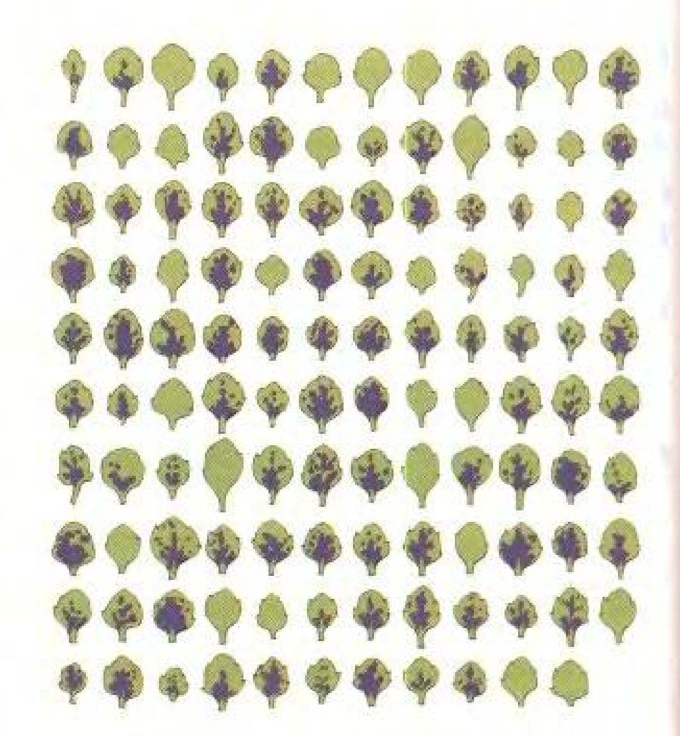
9. Las vacas tipo Holstein son normalmente de color blanco y negro. Un granjero compró por 100 000 dólares un magnífico ejemplar macho de color blanco y negro, Charlie. Todos los hijos que tuvo Charlie eran aparentemente normales. Sin embargo, cuando se cruzaban entre sí, ciertos hijos de Charlie daban lugar a descendientes de color rojo y blanco, con una frecuencia aproximada del 25 por ciento. Charlie fue pronto eliminado de las listas de sementales Holstein de los criadores. Explique de forma detallada por qué, utilizando símbolos.

10. Suponga que un marido y su mujer son heterocigóticos para un alelo recesivo que provoca albinismo. Si tienen gemelos dicigóticos (dos-cigotos), ¿cuál es la probabilidad de que ambos muestren el mismo fenotipo de pigmentación?

11. La planta «Mary ojos azules» crece en la Isla de Vancouver y en las tierras bajas continentales de la Columbia Británica. Las poblaciones son dimórficas para la presencia de manchas moradas en las hojas: algunas plantas las tienen y otras no. Cerca de Namaino, se recogió del campo una planta con hojas manchadas. Esta planta, que no había florecido todavía, se llevó al laboratorio y se permitió su autofecundación. Para estudiar la descendencia, se recogieron y sembraron las correspondientes semillas. Una hoja seleccionada al azar (pero típica) de cada planta descendiente se muestra en la figura de la parte superior:

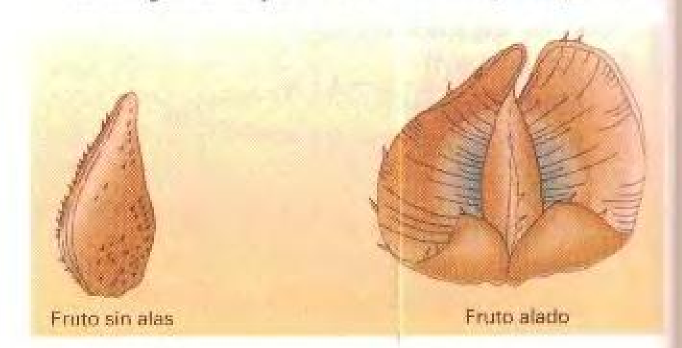
a. Proponga una hipótesis genética que explique estos resultados. Indique los significados de todos los símbolos y muestre todas las clases genotípicas (así como el genotipo de la planta original).

b. ¿Cómo comprobaría su hipótesis? Sea claro.



12. ¿Puede comprobarse de alguna forma que un animal *no* es portador de un alelo recesivo (es decir, que no es heterocigoto para un determinado gen)? Explique su respuesta.

13. En la naturaleza, la planta *Plectritis congesta* es dimórfica para la forma del fruto, es decir, dentro de la misma planta pueden coexistir frutos alados y sin alas, como se muestra en la figura de la parte inferior. Se recogieron plantas del

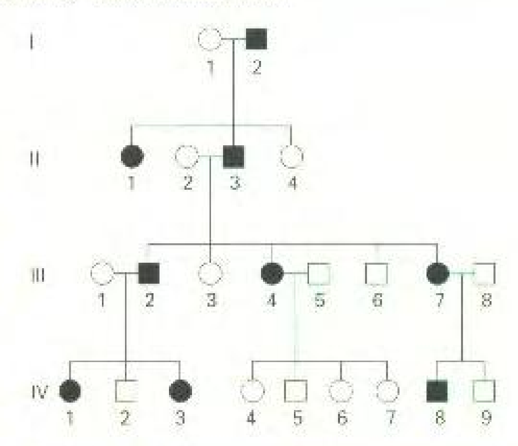


medio natural antes de que florecieran y se cruzaron o se autopolinizaron, obteniéndose los siguientes resultados:

	NÚMERO DE DESCENDIENTES	
Polinización	**Alados**	**Sin alas**
alado (autopolinización)	91	1*
alado (autopolinización)	90	30
sin alas (autopolinización)	4*	80
alado × sin alas	161	0
alado × sin alas	29	31
alado × sin alas	46	0
alado × alado	44	0
alado × alado	24	0

Interprete estos resultados, y explique el modo de herencia de estos fenotipos del fruto, utilizando símbolos. (**Nota:** los fenotipos marcados con un asterisco probablemente tienen una explicación no genética. ¿Qué piensa que significa esto?)

14. El siguiente pedigrí es de una enfermedad hereditaria de la piel, rara y relativamente leve.

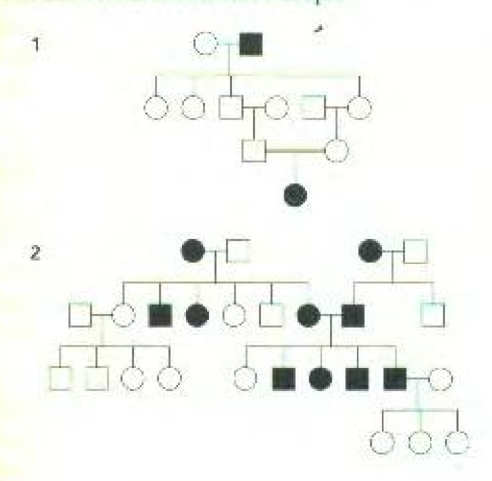


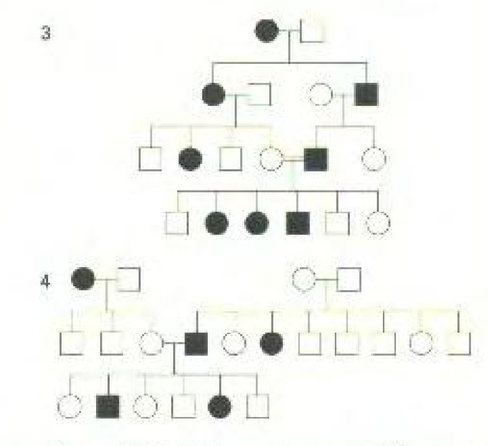
a. ¿Se hereda la enfermedad como un fenotipo recesivo o dominante? Razone su respuesta.

b. Indique los genotipos de tantos individuos del pedigrí como le sea posible (invente sus propios símbolos alélicos)

c. Considere los cuatro hijos no afectados del matrimonio III-4 y III-5. Si tomáramos grupos de cuatro hijos de muchas parejas de este mismo tipo, ¿qué proporción esperaría encontrar de casos en los que los cuatro hijos fueran sanos?

15. A continuación se muestran cuatro pedigríes humanos. Los símbolos negros representan un fenotipo anormal que se hereda de una forma mendeliana simple.





a. Para cada pedigrí, indique si la condición anormal es dominante o recesiva. Indique la lógica de su respuesta.

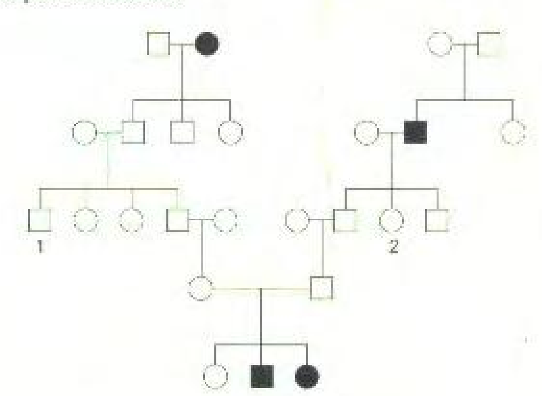
b. Para cada pedigrí, describa el genotipo de cuantos individuos le sea posible.

16. La enfermedad de Tay-Sachs (idiocia amaurótica familiar) es una enfermedad humana poco frecuente producida por la acumulación de sustancias tóxicas en las células nerviosas. El alelo recesivo responsable de la enfermedad se hereda siguiendo un patrón de herencia mendeliana simple. Por razones desconocidas, el alelo es más frecuente en poblaciones de judíos ashkenazis de Europa oriental. Una mujer planea casarse con su primo hermano, pero la pareja descubre que una hermana del abuelo que comparten murió en la infancia de enfermedad de Tay-Sachs.

a. Dibuje las partes importantes del pedigrí, y muestre todos los genotipos de la forma más completa posible.

b. ¿Cuál es la probabilidad de que el primer hijo de los primos sufra la enfermedad de Tay-Sachs, suponiendo que todas las personas que se casan con miembros de la familia son homocigotos normales?

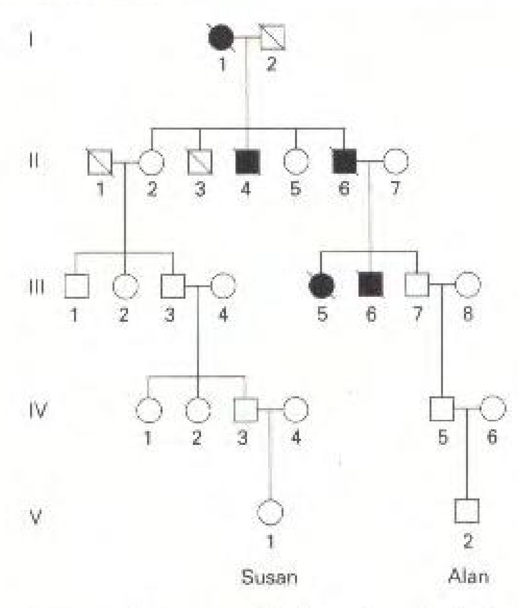
17. Se obtuvo el siguiente pedigrí para una enfermedad del riñón poco frecuente:



a. Indique el modo de herencia de esta enfermedad, razonando su respuesta.

b. Si se casan los individuos 1 y 2, ¿qué probabilidad tienen de que su primer hijo sufra la enfermedad del riñón?

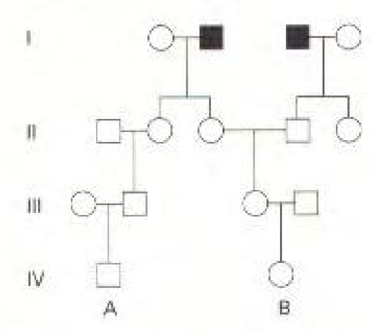
18. El siguiente pedigrí es de la enfermedad de Huntington (HD), un trastorno del sistema nervioso que se desarrolla tardíamente. Las barras inclinadas indican miembros fallecidos de la familia.



a. ¿Es compatible este pedigrí con el modo de herencia de la enfermedad HD descrito en el capítulo?

b. Considere los dos recién nacidos de las dos ramas del pedigrí, Susan en la de la izquierda y Alan en la de la derecha. Analice la gráfica de la Figura 2-21 y dé su opinión sobre la probabilidad de que desarrollen HD. Suponga para ello que los padres tienen los hijos a los 25 años.

19. Considere el siguiente pedigrí de una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente, la PKU.



a. Indique los genotipos de tantos miembros de la familia como le sea posible.

b. Si los individuos A y B se casan, ¿cuál es la probabilidad de que su primer hijo sufra PKU?

c. Si el primer hijo es normal, ¿cuál es la probabilidad de que su segundo hijo sufra PKU?

d. Si el primer hijo sufre PKU, ¿cuál es la probabilidad de que el segundo hijo no esté afectado?

(Suponga que ninguna de las personas que se casan con miembros de la familia llevan el alelo anormal).

20. Un curioso polimorfismo en las poblaciones humanas tiene que ver con la capacidad para enrollar los lados de la lengua hacia arriba hasta casi formar un tubo. Algunas personas pueden hacer este truco, pero otras simplemente no pueden hacerlo. Se trata, por tanto, de un ejemplo de dimorfismo. Su sentido es un misterio completo. En una familia, un chico es incapaz de enrollar la lengua pero, para gran disgusto suyo, su hermana sí puede hacerlo. Ambos padres también pueden enrollar la lengua, así como los dos abuelos, y un tío y una tía paternos. Otro tío y tía paternos y un tío materno no son capaces de hacerlo.

a. Dibuje el pedigrí de esta familia, definiendo los símbolos claramente, y deduzca los genotipos de tantos miembros de la familia como le sea posible.

b. El pedigrí que acaba de dibujar es típico del modo de herencia de la capacidad para enrollar la lengua y llevó a los genetistas a proponer el mecanismo de herencia que, sin duda, usted también ha propuesto. Sin embargo, en un estudio de 33 parejas de gemelos idénticos, se encontró que en 18 de ellas, ambos miembros de la pareja enrollaban la lengua, en 8 parejas ninguno de ellos la enrollaba, y en las 7 parejas restantes uno de los miembros podía hacerlo mientras que el otro no podía. Puesto que los gemelos idénticos provienen de la separación de un óvulo fecundado en dos embriones, los miembros de cada pareja deben ser genéticamente idénticos. ¿Cómo puede reconciliarse la existencia de las siete parejas discordantes con su explicación genética del pedigrí?

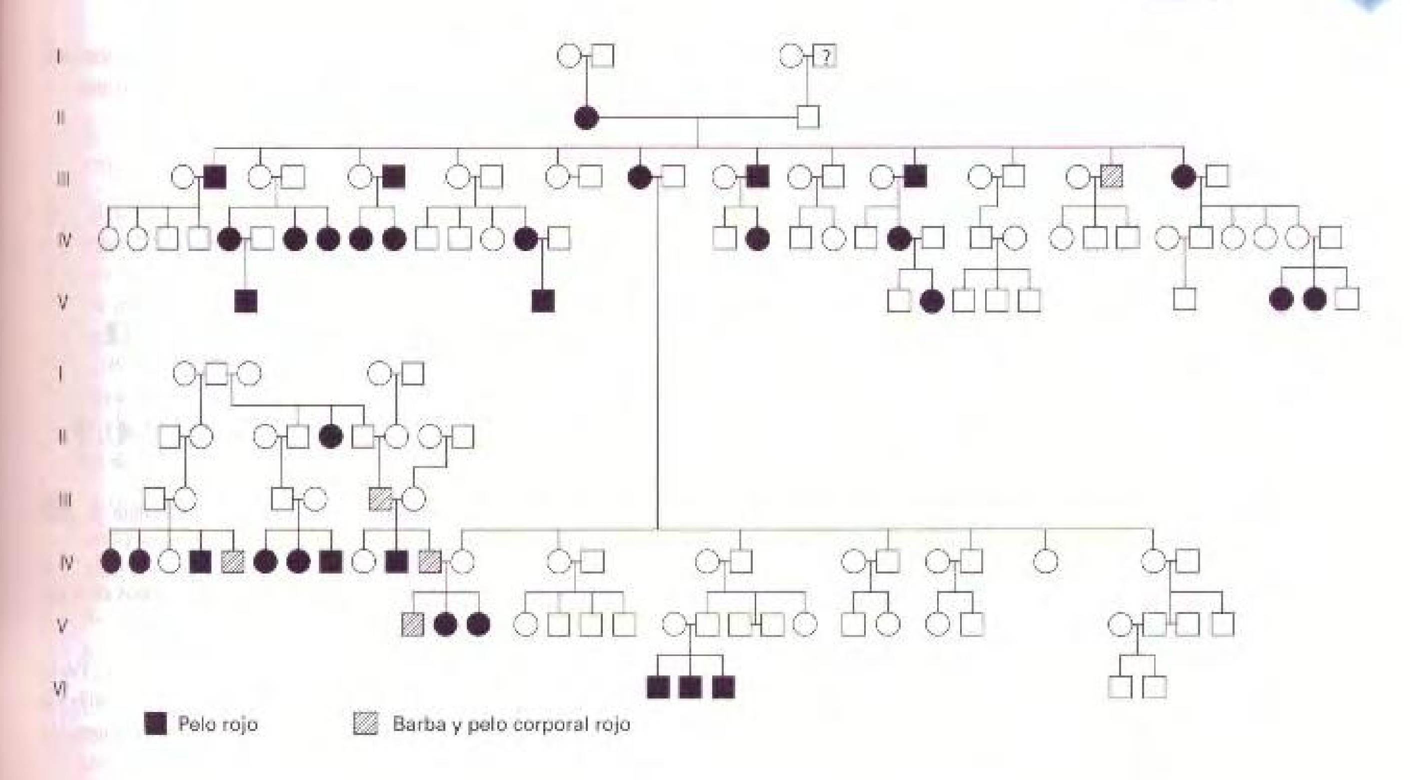
21. Un alelo recesivo poco frecuente, que se hereda de forma mendeliana simple, provoca la fibrosis quística. Un hombre fenotípicamente normal cuyo padre tuvo fibrosis quística se casa con una mujer fenotípicamente normal con la que no está emparentado, y la pareja considera tener un hijo.

a. Dibuje el pedigrí con los datos descritos.

b. Si la frecuencia de heterocigotos para la fibrosis quística en la población es 1 de cada 50 individuos, ¿cuál es la probabilidad de que el primer hijo de la pareja sufra fibrosis quística?

c. Si el primer hijo sufre fibrosis quística, ¿cuál es la probabilidad de que el segundo hijo sea normal?

22. En el pelo humano, los colores negro y marrón se deben a la presencia, en varias cantidades y combinaciones, de unas sustancias químicas denominadas *melaninas*. Sin embargo, el color rojo está producido por un tipo diferente de compuesto químico sobre el que se sabe muy poco. El carácter pelirrojo aparece en familias, y la ilustración (página siguiente, parte superior) muestra un pedigrí numeroso para dicho carácter (Pedigrí obtenido de W.R. Singleton y B. Elli... *Journal of Heredity* 55, 1964, 261.)



a. ¿Sugiere el patrón de herencia de este pedigrí que el color rojo del pelo está provocado por un alelo dominante o recesivo de un gen que se hereda de forma mendeliana simple?

b. ¿Considera que el alelo del pelo rojo es frecuente o poco frecuente en la población en conjunto?

23. Cuando se probó en muchas familias la capacidad para percibir el sabor del compuesto químico PTC, los matrimonios se clasificaron en tres grupos y la descendencia se agrupó, con los siguientes resultados:

Padres	Número de familias	HIJOS Perceptores	No perceptores
perceptor × perceptor	425	929	130
perceptor × no perceptor	289	483	278
no perceptor × no perceptor	86	5	218

Suponiendo que la percepción de PTC es dominante (P) y la no percepción recesiva (p), ¿cómo pueden explicarse las proporciones de descendientes de los tres tipos de matrimonios?

24. En los tomates, el color rojo del fruto es dominante sobre el amarillo, el fruto con dos lóbulos es dominante sobre el fruto con muchos lóbulos, y el tallo largo es dominante sobre el enano. Un mejorador cuenta con dos líneas puras: una es enana, de frutos rojos con dos lóbulos, y la otra es alta, de frutos amarillos con muchos lóbulos. A partir de estas dos líneas, quiere producir, para su comercialización, una línea pura nueva que sea alta y con frutos amarillos y con dos lóbulos. ¿Cómo debería proceder exactamente para conseguirlo? Indique tanto los cruzamientos que deben hacerse como el número de descendientes que debe ser analizado en cada caso.

25. En humanos, tanto el enanismo acondroplásico como la neurofibromatosis son enfermedades dominantes extremadamente poco frecuentes. Si una mujer con acondroplasia se casa con un hombre con neurofibromatosis, ¿qué fenotipos distintos se esperarían entre sus descendientes, y en qué proporciones? (Asegúrese de definir todos los símbolos que use.)

26. En los perros, el color oscuro del pelaje es dominante sobre el albino, y el pelo corto es dominante sobre el largo. Suponga que estos caracteres se deben a dos genes que segregan independientemente y escriba los genotipos de los parentales en los cruzamientos que se muestran a continuación, en los cuales O y A representan los fenotipos oscuro y albino, respectivamente, y C y L, los fenotipos de pelo corto y largo, también respectivamente.

Fenotipos parenterales	NÚMERO DE DESCENDIENTES O, C	O, L	A, C	A, L
a. O,C × O,C	89	31	29	11
b. O,C × O,L	18	19	0	0
c. O,C × A,C	20	0	21	0
d. A,C × A,C	0	0	28	9
e. O,L × O,L	0	32	0	10
f. O,C × O,C	46	16	0	0
g. O,C × O,L	30	31	9	11

Utilice los símbolos O y o para los alelos de color de pelaje oscuro y albino, y C y c para los alelos de pelo corto y largo, respectivamente. Suponga siempre que existe homocigosis, a menos que haya datos en contra. (Problema 26 repro-

ducido con el permiso de Macmillan Publishing Co., Inc., de *Genetics*, de M. Strickberger. Copyright © 1968, Monroe W. Strickberger.)

27. En los tomates, dos alelos de un gen determinan la diferencia en el carácter color del tallo púrpura (P) o verde (V), y dos alelos de un gen independiente determinan la diferencia en el carácter forma de la hoja «cortada» (C) y «patata» (Pa). Los resultados de cinco cruzamientos de plantas de tomate de distintos fenotipos se muestran a continuación:

Cruzamiento	Fenotipos parentales	NÚMERO DE DESCENDIENTES P, C	P, Pa	V, C	V, Pa
1	P, C × V, C	321	101	310	107
2	P, C × P, Pa	219	207	64	71
3	P, C × V, C	722	231	0	0
4	P, C × V, Pa	404	0	387	0
5	P, Pa × V, C	70	91	86	77

a. Determine qué alelos son los dominantes.

b. ¿Cuáles son los genotipos más probables de los parentales en cada cruzamiento?

(Problema 27 de A. M. Srb, R. D. Owen, y R. S. Edgar, *General Genetics*, 2ª ed. Copyright © 1965 W. H. Freeman and Company.)

28. Hasta ahora, hemos manejado fundamentalmente dos genes, pero los mismos principios se aplican a más de dos genes. Considere el siguiente cruzamiento:

A/a ; *B/b* ; *C/c* ; *D/d* ; *E/e* x *a/a* ; *B/b* ; *c/c* ; *D/d* ; *e/e*

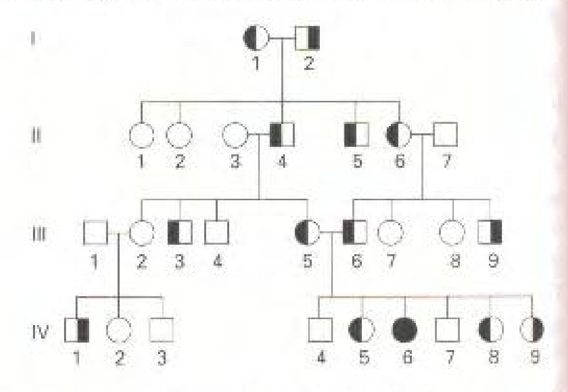
a. ¿Qué proporción de la descendencia será *fenotípicamente* parecida a (1) el primer parental, (2) el segundo parental, (3) cualquiera de los parentales, y (4) ninguno de los parentales?

b. ¿Qué proporción de la descendencia será *genotípicamente* igual a (1) el primer parental, (2) el segundo parental, (3) cualquiera de los parentales, y (4) ninguno de los parentales?

Suponga segregación independiente.

29. La mayoría de las moscas *Drosophila melanogaster* tiene el cuerpo marrón, pero existen miembros de la especie que, por ser homocigotos para el alelo recesivo *y* presentan cuerpo amarillo. Sin embargo, si se alimenta a larvas de líneas puras *Y/Y* con comida que contiene sales de plata, los adultos resultantes son amarillos. Estas moscas se denominan *fenocopias*, copias inducidas ambientalmente de genotipos determinados genéticamente. Si le presentaran una sola mosca amarilla, ¿cómo determinaría si es de genotipo amarillo o una fenocopia amarilla? (¿Se le ocurre algún ejemplo de fenocopia en la población humana?)

30. El pedigrí que se muestra a continuación muestra el patrón de herencia de dos fenotipos humanos poco frecuentes: cataratas y enanismo hipofisario. Los miembros de la familia con cataratas se indican con la parte *izquierda* del símbolo en color negro; los que tienen enanismo hipofisario se indican con la parte *derecha* del símbolo en color negro.



a. ¿Cuál es el modo más probable de herencia de cada uno de los fenotipos? Explique su respuesta.

b. Indique los genotipos de todos los miembros de la generación III de la forma más completa posible.

c. Si tuviera lugar un matrimonio hipotético entre IV-1 y IV-5, ¿cuál sería la probabilidad de que el primer hijo fuera enano y tuviera cataratas? ¿y de que fuera fenotípicamente normal?

(Problema 30 de J. Kuspira y R. Bhambhani, *Compendium of Problems in Genetics*, Copyright © 1994 Wm. C. Brown.)

31. Un genetista que trabaja con maíz dispone de tres líneas puras de genotipos *a/a* ; *B/B* ; *C/C*, *A/A* ; *b/b* ; *C/C*, y *A/A* ; *B/B* ; *c/c*. Todos los fenotipos determinados por *a*, *b* y *c* aumentarán el valor del maíz en el mercado, de modo que naturalmente, quiere combinarlos en una línea pura de genotipo *a/a* ; *b/b* ; *c/c*.

a. Diseñe un programa de cruzamientos efectivo que pueda emplearse para obtener la línea pura *a/a* ; *b/b* ; *c/c*.

b. En cada paso, indique claramente qué fenotipos se seleccionarán y determine cuáles son sus frecuencias esperadas.

c. ¿Existe más de una forma de obtener el genotipo deseado? ¿Cuál es la mejor forma?

(Suponga segregación independiente de los tres genes. **Nota:** el maíz puede realizar autopolinización o polinización cruzada.)

32. **a.** Una población de plantas anuales estaba compuesta exclusivamente por individuos de genotipo *a/a*. Un año, una inundación introdujo en la población muchas semillas de genotipo *A/A* y *A/a*. Inmediatamente después de la inundación, los porcentajes de individuos eran 55 % *A/A*, 40 % *A/a* y 5 % *a/a*. Como en la región no existían insectos capaces de polinizar plantas de esta especie, todas ellas se autopolinizaban de forma rutinaria. Después de tres generaciones de autopolinización, ¿cuáles fueron las proporciones de los genotipos *A/A*, *A/a* y *a/a*?

b. Imagine una planta heterocigota para el 40 % de sus genes (*A/a*, *B/b*, *C/c*, y así sucesivamente). Después de tres

generaciones de autopolinización, ¿qué proporción de sus genes seguirá siendo heterocigota?

c. ¿Cómo se relaciona su respuesta a la parte b con su respuesta a la parte a?

33. El alelo recesivo s es responsable de que *Drosophila* presente alas pequeñas, mientras que el alelo s^+ da lugar a alas normales. Se sabe que este gen está ligado al X. Si se cruza un macho de alas pequeñas con una hembra silvestre homocigótica, ¿qué proporción de moscas con alas normales o pequeñas se esperaría en cada sexo de la F_1? Si se cruzan entre sí moscas de la F_1, ¿qué proporciones esperaría en la F_2? ¿Qué proporciones esperaría si se retrocruzan hembras de la F_1 con su padre?

34. Si suponemos que los cromosomas sexuales son idénticos, indique la proporción de todos sus alelos que tiene en común con

a. su madre

b. su hermano

35. Una gata silvestre bien parecida (G) se cruza con un gato no silvestre muy feo (g). Su descendencia consiste en machos todos bien parecidos y hembras todas muy feas. Interprete estos resultados e indique los genotipos. (Problema 35 tomado de E. H. Simon y H. Grossfield. *The Challenge of Genetics*. Copyright 1971, Addison-Wesley.)

36. Un varón con cierta enfermedad se casa con una mujer normal. Tienen ocho hijos (cuatro niños y cuatro niñas); todas las niñas tiene la enfermedad del padre, pero ninguno de los niños la padece. ¿Qué forma de herencia sugieren estos datos?

a. autosómica recesiva

b. autosómica dominante

c. ligada al Y

d. dominante ligada al X

e. recesiva ligada al X

37. La hipofosfatemia humana se debe a un alelo dominante ligado al X. Un varón con hipofosfatemia se casa con una mujer normal. ¿Qué proporción de sus hijos varones sufrirá la enfermedad?

38. Una enfermedad conocida como ictiosis córnea apareció en un niño a principios del siglo XVIII. Su piel fue engrosando, apareciendo en ellas algunas espinas que se desprendían de vez en cuando. Cuando creció, este «hombre puercoespín» se casó y tuvo seis hijos varones, todos con la enfermedad, y varias hijas, todas normales. Durante cuatro generaciones, la enfermedad se transmitió de padres a hijos varones. A partir de estos datos, ¿cuál es su propuesta acerca de la localización del gen?

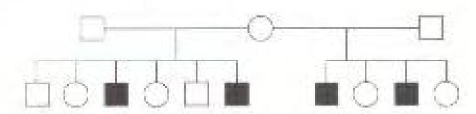
39. La distrofia muscular de Duchenne es una enfermedad ligada al sexo, que normalmente sólo afecta a varones. Las víctimas de la enfermedad se van debilitando progresivamente, apareciendo estos síntomas a edades tempranas.

a. ¿Cuál es la probabilidad de que una mujer cuyo hermano está enfermo tenga un hijo afectado?

b. ¿Cuál es la probabilidad de que reciba el alelo un varón cuyo tío por línea materna sufrió la enfermedad?

c. ¿Cuál es la probabilidad de que reciba el alelo un varón cuyo tío por línea paterna sufrió la enfermedad?

40. El pedigrí adjunto se refiere a una anomalía dental hereditaria, la amelogénesis imperfecta.



a. ¿Qué modo de herencia se ajusta *mejor* a la transmisión de este carácter?

b. Indique el genotipo de todos los miembros de la familia según su hipótesis.

41. En el varón, el alelo c, ligado al sexo y recesivo, provoca ceguera para los colores rojo y verde. Una mujer normal, cuyo padre era ciego para los colores, se casa con un hombre también ciego para los colores.

a. ¿Cuáles son los genotipos posibles de la madre del varón ciego para los colores?

b. ¿Cuál es la probabilidad de que el primer hijo del matrimonio sea un varón afectado de ceguera para los colores?

c. ¿Qué proporción de las hijas de este matrimonio se espera que estén afectadas de ceguera para los colores?

d. De todos los hijos (sin especificar el sexo) del matrimonio, ¿qué proporción se espera que sean normales para la visión de los colores?

42. Los machos del gato doméstico son de color negro o naranja; las hembras son negras, calicó o naranja.

a. Si estos colores se deben a un gen ligado al sexo, ¿cómo se explican estas observaciones?

b. Empleando los símbolos apropiados, indique el fenotipo esperado en la descendencia de un cruzamiento entre una hembra naranja y un macho negro.

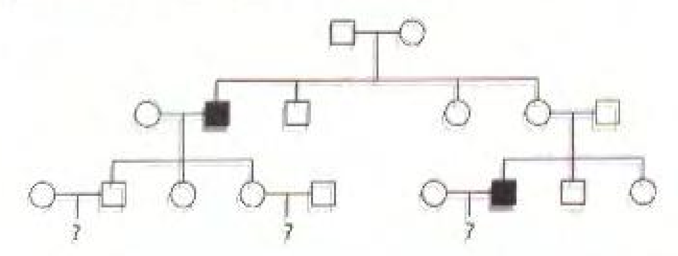
c. Repita la parte b, pero considerando el cruzamiento recíproco al indicado en dicha pregunta.

d. La mitad de las hembras descendientes de cierto cruzamiento son calicó y la otra mitad son negras; la mitad de los machos son naranjas y la otra mitad negros. ¿Qué colores tenían los parentales macho y hembra del cruzamiento?

e. En la descendencia de otro tipo de cruzamiento, aparecieron las proporciones siguientes: $\frac{1}{4}$ machos naranjas, $\frac{1}{4}$ hembras naranjas, $\frac{1}{4}$ machos negros y $\frac{1}{4}$ hembras calicó. ¿Qué colores tenían los parentales macho y hembra?

43. Un varón es heterocigoto para un gen autosómico (B/b) y lleva un alelo d recesivo ligado al X. ¿Qué proporción de sus espermatozoides serán $b\ d$?

44. El siguiente pedigrí se refiere a cierta enfermedad rara que provoca incapacidad pero no es mortal.

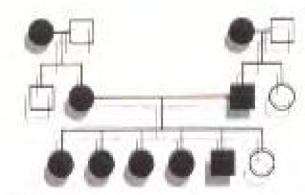


a. Determine el modo de herencia más probable de esa enfermedad.

b. Indique el genotipo de cada individuo de acuerdo con su propuesta de modo de herencia.

c. Si fuera el médico de la familia, ¿cómo aconsejaría a las tres parejas de la tercera generación sobre la probabilidad de tener un hijo afectado?

45. Suponga que este pedigrí no presenta complicaciones, como las que supondrían la existencia de casos de hijos ilegítimos.



El fenotipo W, presente en los individuos marcados con símbolo negro, es poco frecuente en la población general. ¿Cuáles de los siguientes modos de herencia son coherentes con este pedigrí? ¿Cuáles pueden descartarse?

a. autosómico recesivo

b. autosómico dominante

c. recesivo ligado al X

d. dominante ligado al X

e. ligado al Y

(Problema 45 tomado de A. M. Srb, R. D. Owen, y R. S. Edgar, *General Genetics*, 2ª ed., Copyright © 1965, W. H. Freeman and Company.)

46. Un alelo mutante del ratón provoca curvatura en la cola. Se cruzaron seis parejas de ratones. Sus fenotipos y los de su descendencia se muestran en la tabla siguiente. *N* es el fenotipo normal y *C* es el curvado. Deduzca el modo de herencia de este fenotipo.

	PARENTALES		DESCENDENCIA	
Cruzamiento	♀	♂	♀	♂
1	*N*	*C*	Todos *C*	Todos *N*
2	*C*	*N*	$\frac{1}{2}$ *C*, $\frac{1}{2}$ *N*	$\frac{1}{2}$ *C*, $\frac{1}{2}$ *N*
3	*C*	*N*	Todos *C*	Todos *C*
4	*N*	*N*	Todos *N*	Todos *N*
5	*C*	*C*	Todos *C*	Todos *C*
6	*C*	*C*	Todos *C*	$\frac{1}{2}$ *C*, $\frac{1}{2}$ *N*

a. El alelo mutante ¿es dominante o recesivo?

b. ¿Es autosómico o ligado al sexo?

c. ¿Cuáles son los genotipos de todos los parentales y s hijos?

47. En *Drosophila*, el color normal de los ojos es el rojo, pe existen estirpes en las que todas las moscas tienen los ojos m rrones. Igualmente, las alas normales son largas, pero hay est pes de alas cortas. Una hembra de una línea pura de ojos marr nes y alas cortas se cruza con un macho de una línea pu normal. La F_1 está compuesta por hembras normales y mach de alas cortas. Cruzando entre sí los individuos de la F_1, se obt ne la F_2. En *ambos* sexos de las moscas F_2 encontramos los s guientes fenotipos:

$\frac{3}{8}$ ojos rojos, alas largas

$\frac{3}{8}$ ojos rojos, alas cortas

$\frac{1}{8}$ ojos marrones, alas largas

$\frac{1}{8}$ ojos marrones, alas cortas

Proponga un modo de herencia para estos fenotipos, utilizan símbolos genéticos claramente definidos de su propia invenció Indique los genotipos de las tres generaciones y las proporcion genotípicas de la F_1 y la F_2.

El problema paso a paso

Antes de intentar resolver el problema, trate de responder a l siguientes preguntas.

1. ¿Qué significa la palabra «normal» en este problema?
2. En este problema se manejan las palabras «línea» y «est pe». Diga qué significan y si son términos intercambiables.
3. Dibuje simplificadamente las dos moscas parentales, mo trando sus ojos, alas y diferencias sexuales.
4. ¿Cuántos caracteres diferentes aparecen en este problem
5. ¿Cuántos fenotipos aparecen en este problema, y cuá son los fenotipos que acompañan a los caracteres mencionad anteriormente?
6. ¿Cuál es el fenotipo completo de las hembras de la F_1 q se han descrito como «normales»?
7. ¿Cuál es el fenotipo completo de los machos de la F_1 q se han descrito como de «alas cortas»?
8. Construya una lista con las proporciones fenotípicas de F_2 para cada uno de los caracteres que aparezcan en su respue al apartado 4.
9. ¿Qué le sugieren las proporciones fenotípicas de la F_2?
10. ¿Cuál es el patrón de herencia fundamental que diferen a la herencia ligada al X de la herencia autosómica?
11. ¿Muestran los datos de la F_2 dicho criterio diferencial?
12. ¿Muestran los datos de la F_1 dicho criterio diferencial?
13. ¿Qué puede deducirse sobre la dominancia en la F_1? ¿Y la F_2?

14. ¿Qué reglas sobre la utilización de símbolos en la estirpe silvestre puede emplear a la hora de decidir qué símbolos usar para estos cruzamientos?

15. ¿Qué significa «proponga un modo de herencia para estos fenotipos»?

Intente ahora resolver el problema. Si no es capaz de hacerlo, haga una lista con los aspectos que no comprenda. Analice los conceptos clave del principio del capítulo y pregúntese cuáles son importantes con respecto a sus preguntas. Si todo ello aún no funciona, analice los corolarios del capítulo y pregúntese cuáles son importantes para sus preguntas.

48. El tipo silvestre (W) de la mariposa *Abraxas* presenta manchas grandes en sus alas, pero en la variedad lacticolor de esta especie (L), las manchas son muy pequeñas. Se realizaron cruzamientos entre estirpes que diferían para este carácter, con los siguientes resultados:

	PARENTERALES		DESCENDENCIA	
Cruzamiento	♀	♂	F_1	F_2
1	L	W	♀ W ♂ W	♀ ½ L, ½ W ♂ W
2	W	L	♀ L ♂ W	♀ ½ W, ½ L ♂ ½ W, ½ L

Proponga una explicación genética clara de los resultados de estos cruzamientos, indicando los genotipos de todos los individuos.

49. Cierto gen que gobierna la actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) presenta dos alelos comunes en poblaciones de África y del Mediterráneo. Un alelo determina la actividad G6PD normal, y el otro alelo, que confiere resistencia al paludismo, determina una actividad G6PD reducida.

Al examinar con el microscopio los glóbulos rojos de cierta mujer africana, se descubrió que exactamente la mitad de sus células contenían el parásito del paludismo, mientras que la otra mitad parecían sanas. Ofrezca una explicación genética a este descubrimiento.

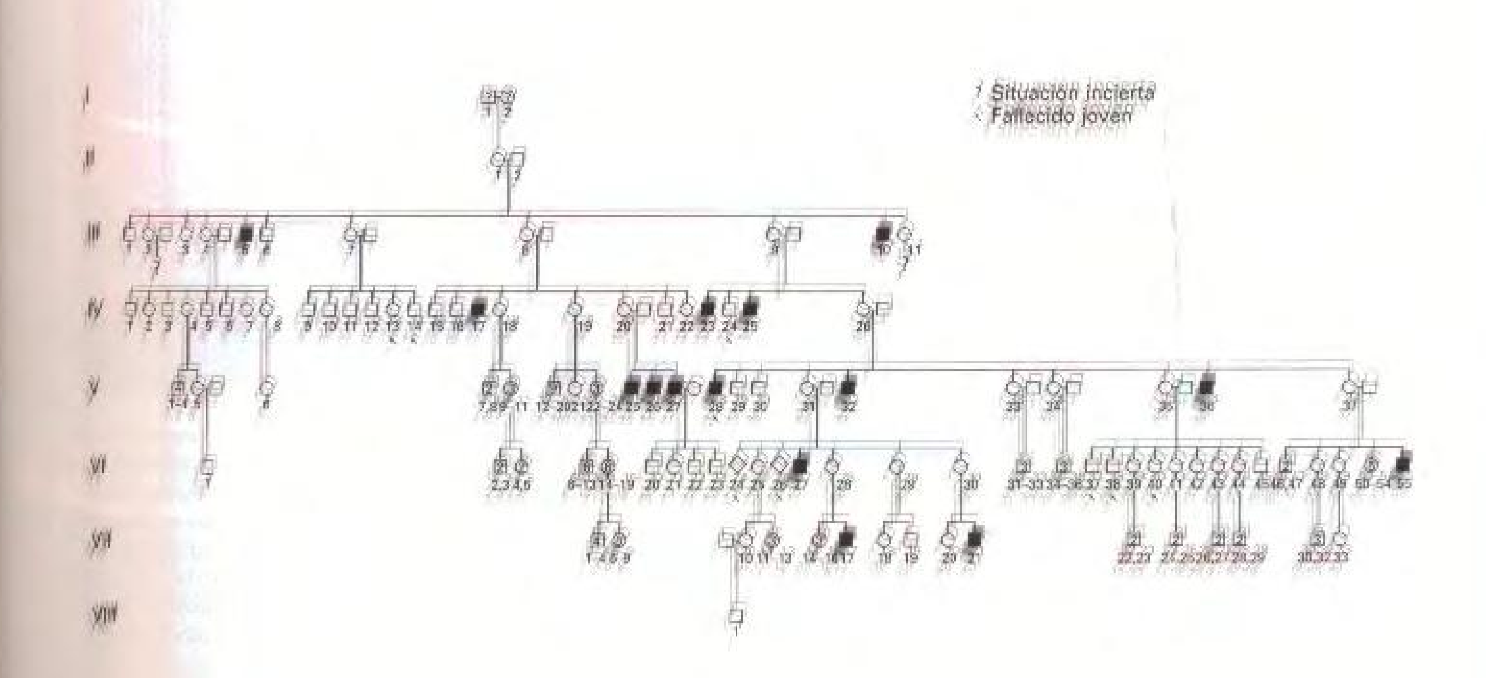
50. La bibliografía médica recoge el interesante caso de una mujer cuya mama derecha era mayor que la izquierda, que carecía de vello púbico en el lado derecho, y que sufría de irregularidades menstruales. Tras investigar a otros miembros de su familia, se descubrió que un hermano, un hijo y un nieto presentaban el síndrome de feminización testicular. Una de sus hijas tenía tres hijos normales. Con esta información, dibuje un pedigrí, determine si encaja con el modo de herencia descrito en este capítulo y especule sobre la causa de los síntomas de la mujer *propositus*.

51. El pedigrí mostrado abajo corresponde a una rara enfermedad humana llamada paraplejía espasmódica, un defecto del sistema nervioso que provoca incapacidad para coordinar los movimientos voluntarios.

a. ¿Qué modo de herencia sugiere este pedigrí?

b. Según su modelo, ¿qué individuos deben ser homocigotos?

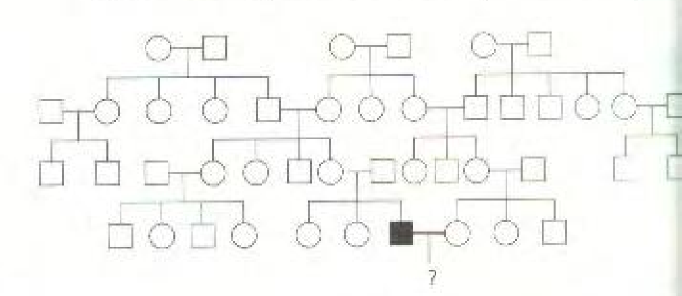
(Pedigrí tomado de V. A. Mckusick, *On the Chromosomes of Man*. Copyright © 1964, American Institute of Biological Science, Washington, D.C.)



52. El pedigrí indicado arriba muestra la transmisión de una enfermedad humana poco frecuente. Su modo de herencia, ¿se explica mejor por un alelo recesivo ligado al X o por un alelo autosómico dominante de expresión limitada a los varones? (Pedigrí modificado de J. F. Crow, *Genetics Notes*, 6ª ed. Copyright ©1967 Burgers Publishing Company, Minneapolis.)

53. En la especie humana, la visión del color depende de genes que determinan tres pigmentos. Los genes *R* (pigmento rojo) y *G* (pigmento verde) están en el cromosoma X, mientras que *B* (pigmento azul) es autosómico. Una mutación en cualquiera de estos genes puede provocar ceguera a los colores. Suponga que un hombre con ceguera a los colores se casó con una mujer de visión normal. Todos sus hijos fueron ciegos a los colores, y todas sus hijas fueron normales. Especifique los genotipos de ambos padres y de todos los posibles hijos, explicando su razonamiento (dibujar un pedigrí probablemente le ayudará). (Problema de Rosemary Redfield.)

54. Cierto tipo de sordera en humanos se hereda como un ca- rácter recesivo ligado al X. Un varón que sufre este tipo de



sordera se casa con una mujer normal, y están esperando un hijo. Descubren que están lejanamente emparentados. A continuación se muestra parte de su árbol familiar.

¿Cómo aconsejaría a sus padres sobre la probabilidad de que su hijo sea un niño (varón) sordo, una niña sorda o una niña normal? Asegúrese de hacer constar cualquier suposición que haga.

3

Bases cromosómicas de la herencia



Cromosomas en escobilla.
Los cromosomas de las hembras de algunos animales adoptan este aspecto de escobillas durante la fase meiótica diplotene. Se cree que la estructura en escobilla refleja la organización interna de todos los cromosomas: un esqueleto central (de aspecto brillante en esta fotografía) del que se proyectan unos lazos laterales (en rojo), formados por una molécula continua de DNA, plegada y asociada a histonas. *(M. Roth y J. Gall.)*

Ideas fundamentales

Los genes forman parte de los cromosomas.

La mitosis es la división nuclear que da lugar a dos núcleos hijos, cada uno de los cuales contiene idéntico material genético que el núcleo original.

La meiosis es la división nuclear mediante la cual una célula reproductora con dos dotaciones equivalentes de cromosomas, se divide dos veces para dar cuatro productos meióticos, cada uno de los cuales contiene una sola dotación de cromosomas.

Las leyes de Mendel sobre la distribución igualitaria y la segregación independiente se basan en la separación de los miembros de cada pareja cromosómica y en la independencia de los distintos pares cromosómicos, fenómenos que ocurren durante la meiosis.

Los cromosomas pueden identificarse con el microscopio mediante el empleo de varios marcadores visibles.

Un cromosoma está formado por una única molécula de DNA muy larga.

El DNA está enrollado alrededor de complejos de proteínas que, a su vez, se enrollan y forman lazos y nuevos enrollamientos sobre sí mismos hasta formar el cromosoma.

Una gran proporción del DNA eucariótico está presente en varias copias.

La mayoría del DNA repetido posee una función desconocida.

La belleza del análisis de Mendel está en que no se necesita conocer qué son los genes o cómo provocan un determinado fenotipo, para estudiar los resultados de un cruzamiento y predecir los de cruzamientos futuros, siguiendo las leyes de la distribución igualitaria y la segregación independiente. Todo ello es posible simplemente representando los hipotéticos factores abstractos de la herencia (los genes) mediante símbolos, sin preocuparnos acerca de su estructura molecular o su localización celular. No obstante, nuestro interés gira naturalmente en torno a las siguientes cuestiones: ¿dónde están localizados los genes en la célula? y ¿cuál es la forma exacta en que se llevan a cabo la segregación y la distribución independiente a nivel celular?

Un avance importante en el desarrollo de la Genética fue la noción de que los genes, tal como habían sido definidos por Mendel, forman parte de estructuras celulares específicas, los cromosomas. Este concepto tan simple ha llegado a ser conocido como la **teoría cromosómica de la herencia**. Aunque simple, la idea ha tenido profundas implicaciones, puesto que ha permitido correlacionar los resultados de ciertos cruzamientos con la conducta de unas estructuras que pueden observarse realmente al microscopio. Esta fusión entre las disciplinas de la Genética y la Citología es todavía hoy un aspecto esencial del análisis genético y tiene aplicaciones importantes en la Genética clínica, la Genética agrícola y la Genética evolutiva. En primer lugar, desarrollaremos la historia de esta teoría.

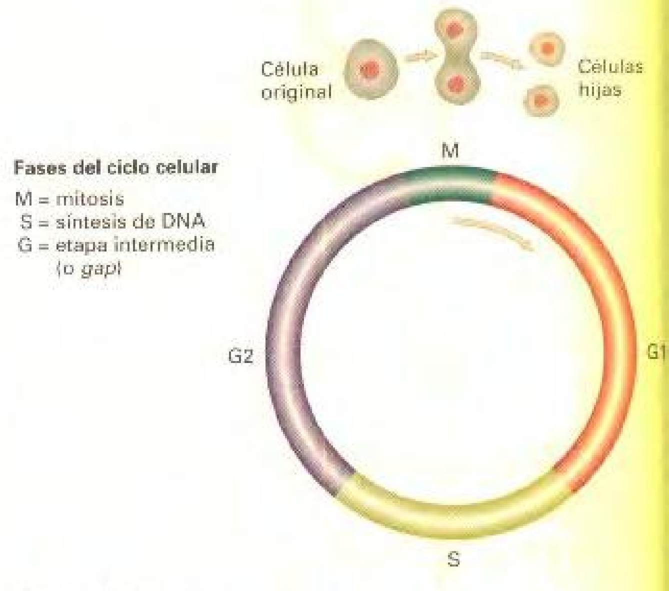
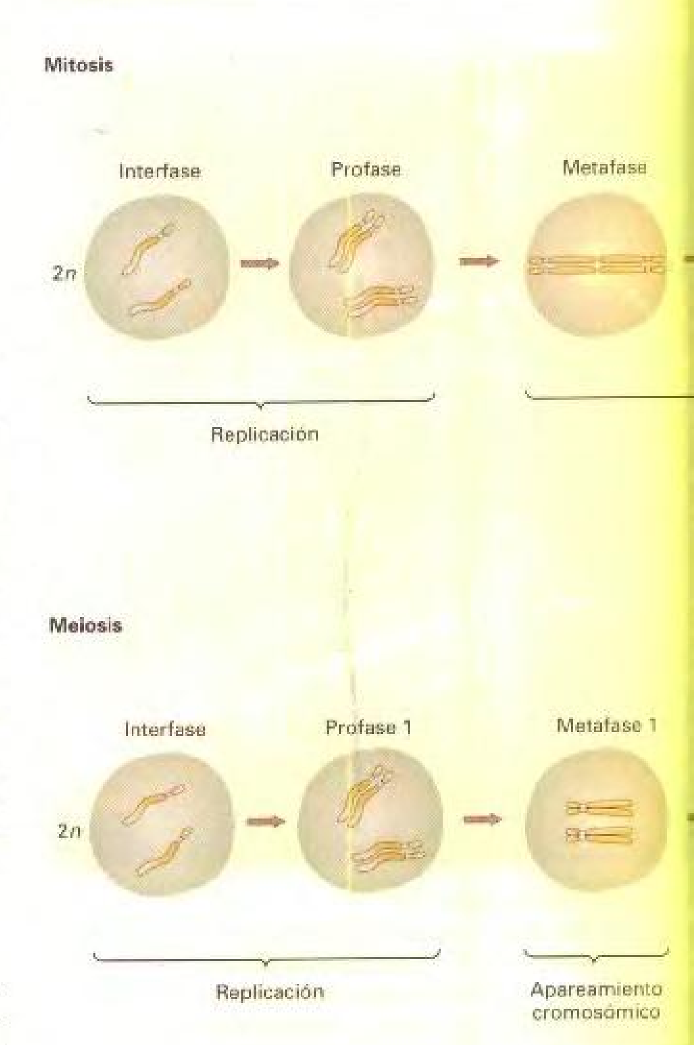


Figura 3-1. Fases del ciclo celular.



Desarrollo histórico de la teoría cromosómica

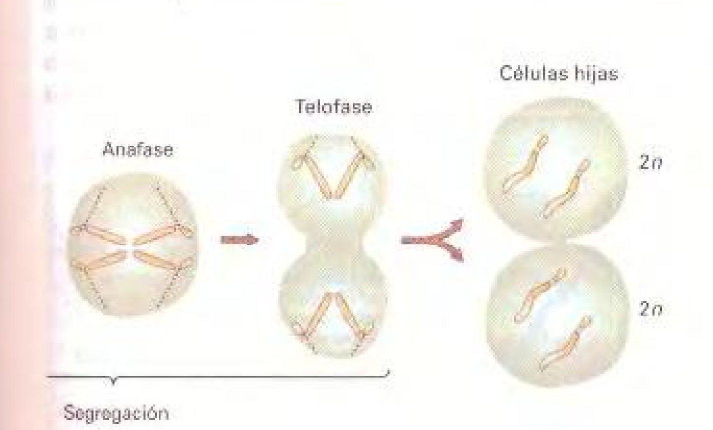
¿Cómo tomó forma la teoría cromosómica? Las pruebas se acumularon de forma gradual a partir de distintas fuentes. Una de las primeras pruebas vino del comportamiento de los cromosomas durante la división nuclear de las células. En el período de tiempo entre las investigaciones de Mendel y su redescubrimiento, muchos biólogos estaban interesados en la herencia, aunque no eran conscientes de los resultados de Mendel y abordaban el problema de una manera completamente distinta. Estos investigadores prestaron atención a la naturaleza física del material hereditario. Un lugar obvio para buscarlo eran los gametos, que constituyen los únicos elementos de enlace entre las generaciones. Considerando que el óvulo y el espermatozoide difieren en tamaño pero contribuyen por igual al legado genético de los descendientes, el citoplasma no parecía el alojamiento más probable de las estructuras hereditarias. Se sabía, sin embargo, que los núcleos eran aproximadamente del mismo tamaño en el óvulo y en el espermatozoide, de modo que se consideraron buenos candidatos para contener las estructuras hereditarias.

Descubrimiento de la división nuclear

¿Qué se sabía sobre el contenido del núcleo celular? Pronto, se hizo evidente que los componentes más conspicuos eran los cromosomas, los cuales resultaron poseer propiedades únicas que los diferenciaba del resto de las estructuras celulares. Una propiedad que intrigaba especialmente a los biólogos era la constan-

cia del número de cromosomas de una célula a otra dentro de un organismo, de un organismo a otro de la misma especie y de generación en generación en esa especie. En consecuencia, se planteó la siguiente pregunta: ¿Cómo se mantiene el número de cromosomas? La pregunta se resolvió observando con el microscopio el comportamiento de los cromosomas durante la división celular; de tales observaciones surgió la hipótesis de que los cromosomas son las estructuras portadoras de los genes.

La **mitosis** es la división nuclear asociada a la división de las células somáticas (las células de un organismo eucariótico que no van a convertirse en células sexuales). Las etapas del ciclo de división celular (Fig. 3-1) son similares en la mayoría de los organismos. Las dos partes fundamentales del ciclo son la **interfase** (que abarca la fase G_1, la fase de síntesis y la fase G_2) y la mitosis. El acontecimiento clave de la interfase tiene lugar en la **fase S** (fase de síntesis) en la cual se replica el DNA de cada cromosoma. La consecuencia de la replicación del DNA es que todos los cromosomas están compuestos por dos **cromátidas hermanas**, que se extienden longitudinalmente una junto a la otra. Estas cromátidas hermanas no se observan durante la interfase, pero se hacen visibles durante la **profase**, una etapa temprana de la mitosis durante la cual los cromosomas se contraen en una serie de estructuras espirales que pueden desplazarse más fácilmente. Una versión simplificada de los principales acontecimientos de la mitosis se muestra en la Figura 3-2. La siguiente etapa es la **metafase**, en la cual cada pareja de cromátidas hermanas se sitúa en el plano ecuatorial de la célula. En la **anafase**, las cromátidas hermanas son empujadas a los polos opuestos de la célula mediante microtúbulos que se unen a los centrómeros. Los microtúbulos forman parte del **huso acromático**, una serie de fibras paralelas que se extienden de un polo a otro de la célula. El proceso de separación de las cromátidas se completa en la **telofase**, durante la cual la membrana nuclear se reconstituye alrededor de cada núcleo y la célula se divide en dos **células hijas**. Cada una de ellas hereda una cromátida de cada pareja de cromátidas hermanas, obteniendo así una copia de cada cromo-



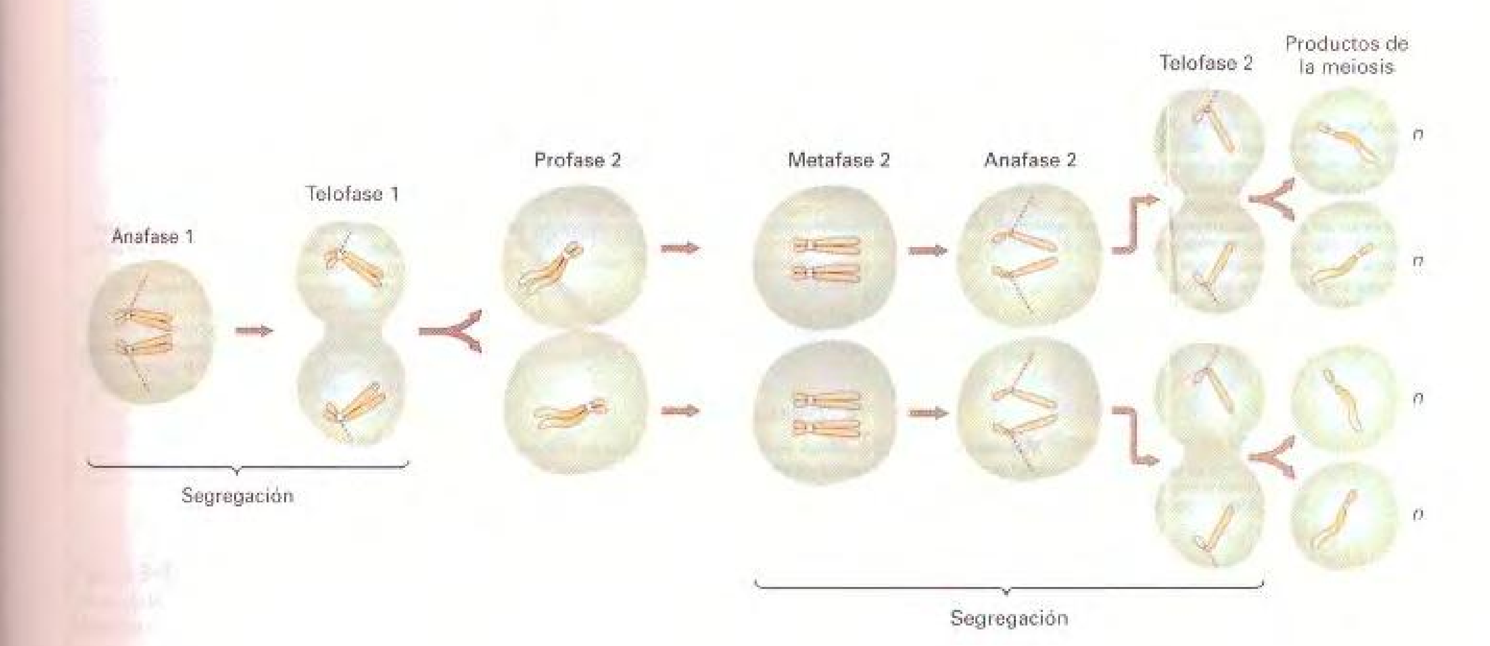


Figura 3-2. Representación simplificada de la mitosis y la meiosis en células diploides (2*n*, diploide; *n*, haploide). Se muestran otras versiones detalladas en las Figuras 3-3 y 3-4.

soma. Por tanto, este tipo de división produce dos células genéticamente idénticas a una única célula progenitora. Divisiones celulares sucesivas y las divisiones mitóticas acompañantes tienen como resultado una población de células idénticas genéticamente. Por ejemplo, la mitosis es el tipo de división que permite a un organismo pluricelular ser construido a partir de una única célula huevo o cigoto. Partiendo de esta descripción simplificada, vemos que los dos procesos fundamentales de la mitosis son la *replicación del DNA* seguida de la *segregación*. La segregación es el nombre que se da a la separación de los dos cromosomas homólogos o de las cromátidas. (En la Fig. 3-3 se muestra una descripción completa de la mitosis en una planta.)

Aunque los primeros investigadores no conocían el DNA ni que se replicaba durante la interfase, ya resultaba evidente que la mitosis era el proceso mediante el cual se mantenía el número de cromosomas durante la división celular. Por tanto, los cromosomas parecían ser los candidatos naturales para contener los genes. No obstante, quedaba aún un problema concerniente a la unión de los dos gametos en el proceso de fecundación. Sabían que en dicho proceso los dos núcleos se fusionan, pero aun así, el número de cromosomas permanece constante. ¿Qué es lo que impide la duplicación del número de cromosomas en cada generación? Este enigma se resolvió tras la predicción de un tipo de división especial que *reducía a la mitad* el número de cromosomas. Dicha división especial, que fue descubierta finalmente en tejidos productores de gametos de plantas y animales, se denomina *meiosis*. La Figura 3-2 muestra un esquema simplificado de ésta.

Meiosis es el nombre que reciben las dos divisiones nucleares sucesivas, denominadas meiosis I y meiosis II, de unas células especiales denominadas **meiocitos**. Las dos divisiones meióticas y sus divisiones celulares acompañantes dan lugar a un grupo de cuatro células denominadas **productos meióticos**. En los animales y las plantas, los productos meióticos se transforman en **gametos** haploides. En la especie humana y otros animales, la meiosis tiene lugar en las gónadas, y los productos de la meiosis se denominan gametos: esperma (o más apropiadamente, espermatozoides) y óvulos. En las plantas con flor, la meiosis tiene lugar en las anteras y los ovarios, y los productos de la meiosis se llaman **meiosporas**, que al final darán lugar a los gametos. La meiosis viene precedida por una fase S en la que se replica el DNA de cada cromosoma para formar las cromátidas hermanas, tal y como sucede en la mitosis. Como en la mitosis, las cromátidas hermanas se vuelven visibles en la profase I. Sin embargo, a diferencia de la mitosis, los cromosomas homólogos se emparejan (en la metafase I) para formar grupos de cuatro cromátidas denominados **tétradas**. Las cromátidas no hermanas se acoplan en un proceso de ruptura y reunión denominado **recombinación**, que se trata con detalle en el Capítulo 5. En la anafase I, cada uno de los dos pares de cromátidas hermanas es empujado hacia

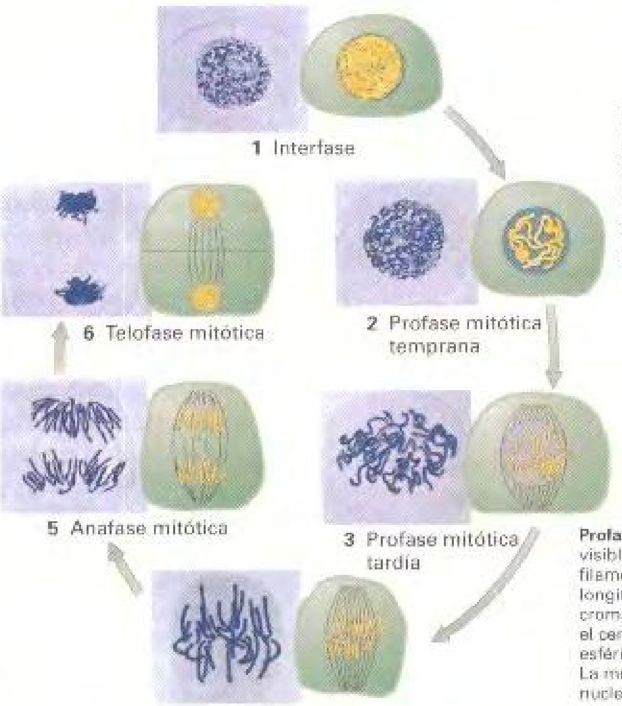
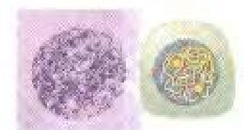
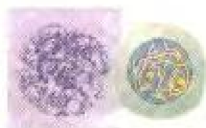


Figura 3-3. La mitosis. Las fotografías muestran los núcleos de las células del ápice de la raíz de *Lilium regale*. (De J. McLeish y B. Snoad, *Looking at Chromosomes*. Copyright © 1958, St. Martin's, Macmillan.)



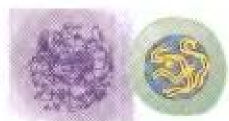
1 Leptotene

Profase I: Leptotene. Los cromosomas se hacen visibles y aparecen como hilos largos y delgados. El proceso de contracción cromosómica continúa durante el leptotene y a lo largo de toda la profase. Se forman a lo largo de cada cromosoma pequeñas áreas de engrosamiento (cromómeros), que dan a los cromosomas el aspecto de collares de perlas.



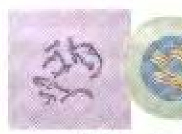
2 Zigotene

Profase I: Zigotene. Los cromosomas se emparejan de forma activa, haciéndose evidente que la dotación cromosómica de un meiocito está formada, en realidad, por dos dotaciones cromosómicas completas. De modo que cada cromosoma tiene un cromosoma compañero, al que se va adosando progresivamente (sinapsis), lado a lado, como una cremallera.



3 Paquitene

Profase I: Paquitene. Esta etapa se caracteriza por la presencia de gruesos cromosomas en sinapsis. Así pues, el número de pares homólogos de cromosomas en el núcleo es igual al número n. A menudo se observan en paquitene los nucleolos de forma muy pronunciada. Los cromómeros quedan alineados de forma precisa en los homólogos apareados, dando lugar a un patrón específico para cada par.



4 Diplotene

Profase I: Diplotene. Aunque cada cromosoma homólogo parezca estar formado por una sola fibra durante leptotene, el DNA ya se había replicado en realidad durante la fase S premeiótica. Esto se manifiesta durante el diplotene como un desdoblamiento longitudinal de cada homólogo apareado. Puesto que cada miembro de un par homólogo da lugar a dos cromátidas hermanas, la estructura en sinapsis consiste ahora en un manojo de cuatro cromátidas homólogas. En diplotene, el apareamiento de los homólogos se hace menos compacto; de hecho, parecen repelerse uno al otro y, al separarse ligeramente, se observan estructuras en forma de cruz (quiasmas) entre las cromátidas no hermanas. Cada grupo homólogo de cuatro tiene generalmente uno o más quiasmas.



5 Diacinesis

Profase I: Diacinesis. Esta etapa se diferencia muy poco de la diplotene, excepto porque ocurre una mayor contracción cromosómica. Al final de la diacinesis, las largas fibras filamentosas de la interfase han sido sustituidas por unidades compactas que son mucho más manejables para los desplazamientos producidos durante la división meiótica.



6 Metafase I

Metafase I: La membrana nuclear y los nucléolos desaparecen durante la metafase I, y cada par de homólogos ocupa un lugar en el plano ecuatorial. En esta etapa de la meiosis, los centrómeros no se dividen; esta falta de división representa una gran diferencia con respecto a la mitosis. Los dos centrómeros de cada par de cromosomas homólogos se unen a las fibras del huso de polos opuestos.



7 Anafase temprana I

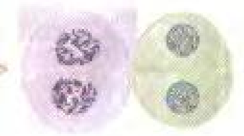
8 Anafase tardia I

Anafase I: La anafase comienza cuando los cromosomas se mueven en dirección a los polos. Cada uno de los miembros de un par homólogo se mueve hacia polos opuestos.

9 Telofase I

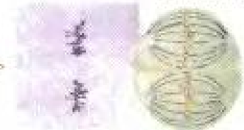
10 Interfase

Telofase I: La telofase y la interfase resultante, denominada intercinesis, no son universales. En muchos organismos estas etapas no existen, no se vuelve a formar la membrana nuclear y las células pasan directamente a la meiosis II. En otros organismos, la telofase I y la intercinesis son muy breves; los cromosomas se alargan y se hacen difusos, y la membrana nuclear vuelve a formarse. En todo caso, nunca hay síntesis de DNA en este momento y el estado genético de los cromosomas no varía.



11 Profase II

Profase II: La presencia del número haploide de cromosomas en estado condensado caracteriza la profase



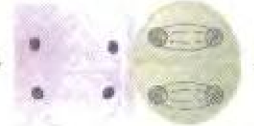
12 Metafase II

Metafase II: Los cromosomas se organizan en el plano ecuatorial durante la metafase II. En este momento, las cromátidas a menudo se separan entre sí parcialmente en lugar de estar firmemente adosadas como en la



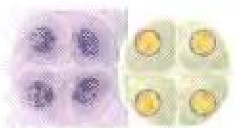
13 Anafase II

Anafase II: Los centrómeros se separan y las cromátidas hermanas son arrastradas hacia polos opuestos por las fibras del



14 Telofase II

Telofase II: Los núcleos vuelven a formarse alrededor de los cromosomas en



15 Tetrada

16 Granos jóvenes de polen

En las anteras de la flor, los cuatro productos de la meiosis se diferencian en granos de polen. En otros organismos, la diferenciación da lugar a otros tipos de estructuras a partir de los productos meióticos, como los espermatozoides de los animales.

Figura 3-4. La meiosis y la formación del polen. Las fotografías provienen de *Lilium regale*. **Nota:** Por simplicidad, se representan varios quiasmas entre sólo dos de las cromátidas; en la realidad, pueden tomar parte las cuatro cromátidas. (De J. McLeish y B. Snoad, *Looking at Chromosomes*. Copyright © 1958, St. Martin's, Macmillan.)

un núcleo distinto de las células hijas. En la anafase II, las propias cromátidas hermanas se separan en los dos núcleos hijos que resultan de esa división. Por consiguiente, vemos que los acontecimientos fundamentales de la meiosis son la *replicación* del DNA, seguida del *apareamiento* de homólogos, de la *segregación* y luego de otra *segregación*. Por tanto, para cada tipo cromosómico, el número de moléculas de DNA va de 2 → 4 → 2 → 1, y cada *producto de la meiosis* ha de contener, por tanto, un cromosoma de cada tipo, la mitad del número que contenía el meiocito original. (En la Fig. 3-4 se da una descripción detallada de la meiosis.)

COROLARIO

Durante la *mitosis*, cada cromosoma se replica para formar las cromátidas hermanas, las cuales segregan a las células hijas. Durante la *meiosis*, cada cromosoma se replica para formar las cromátidas hermanas. Los cromosomas homólogos se aparean físicamente y segregan en la primera división. Las cromátidas hermanas segregan en la segunda división.

El mérito de la teoría cromosómica de la herencia (la idea de que las hipotéticas entidades invisibles denominadas genes forman parte de estructuras visibles denominadas cromosomas) se atribuye generalmente a Walter Sutton (un norteamericano que por entonces era un estudiante de doctorado) y a Theodor Boveri (un biólogo alemán). En 1902, ambos investigadores, por separado, cayeron en la cuenta de que el comportamiento de las partículas de Mendel durante la producción de los gametos del guisante mostraba un paralelismo exacto con la conducta de los cromosomas en la meiosis: los genes vienen en parejas (como los cromosomas); los alelos de un gen se distribuyen igualitariamente en los gametos (como los miembros de un par de cromosomas homólogos); genes distintos actúan de forma independiente (como los diferentes pares de cromosomas). Tras reconocer tal paralelismo (resumido en la Fig. 3-5), ambos investigadores llegaron a la misma conclusión: la similitud entre el comportamiento de los genes y los cromosomas indicaba que los genes están situados en los cromosomas.

Por tanto, el análisis de la mitosis y la meiosis parecía apuntar a la misma conclusión. La teoría cromosómica no parecerá muy revolucionaria para un estudiante actual de Biología. A principios del siglo veinte, sin embargo, la hipótesis de Sutton-Boveri (que conectaba la Citología y el naciente campo de la Genética) fue un bombazo. La respuesta inicial a la publicación de la hipótesis fue buscarle «agujeros» que la desacreditaran. Durante muchos años, se produjo una feroz controversia acerca de la validez de la teoría cromosómica de la herencia.

Merece la pena repasar algunas de las objeciones levantadas contra la teoría de Sutton-Boveri. Por ejemplo, en su tiempo, no podían detectarse los cromosomas en la interfase (el intervalo entre dos divisiones celulares). Boveri tuvo que realizar algunos estudios muy detallados sobre la posición de los cromosomas antes y después de la interfase, para defender que los cromosomas mantienen su integridad física durante la interfase, aunque en ese momento fueran citológicamente invisibles. También se argumentó que los cromosomas son muy parecidos entre sí en algunos organismos, de forma que podrían estar apareando al azar, cuando las leyes de Mendel obligan a una segregación ordenada de los alelos. No obstante, se demostró que, en especies cuyos cromosomas se distinguen en forma y tamaño, aparecen pares de cromosomas iguales y que éstos se aparean y separan físicamente durante la meiosis.

En 1913, Elinor Carothers observó una situación cromosómica inusual en cierta especie de saltamontes (una situación que permitía una demostración directa de si diferentes parejas de cromosomas se separan en realidad de forma independiente). Estudiando los testículos del saltamontes, encontró un par de cromosomas constituido por dos miembros no idénticos; esto se conoce como par heteromorfo y, presumiblemente, los cromosomas muestran sólo una homología parcial. Además, observó que otro cromosoma, no relacionado con el par heteromórfico, no tenía

Factores mendelianos | Cromosomas

Apareamiento cromosómico: A, a

Segregación: A, a

Distribución independiente: A B, a b o A b, a B

Figura 3-5. Paralelismo entre el comportamiento de los genes mendelianos y los cromosomas durante la meiosis. Uno de los cromosomas del par homólogo se representa en un color más oscuro que el otro.

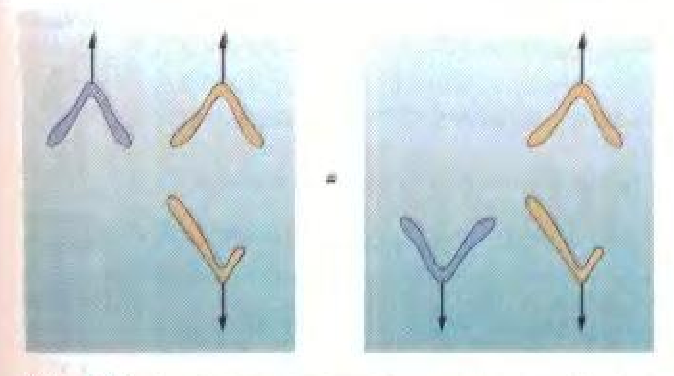


Figura 3-6. Las dos formas, igualmente frecuentes, de segregación de un par heteromorfo y un cromosoma desapareado para formar gametos, según como las observó Carothers.

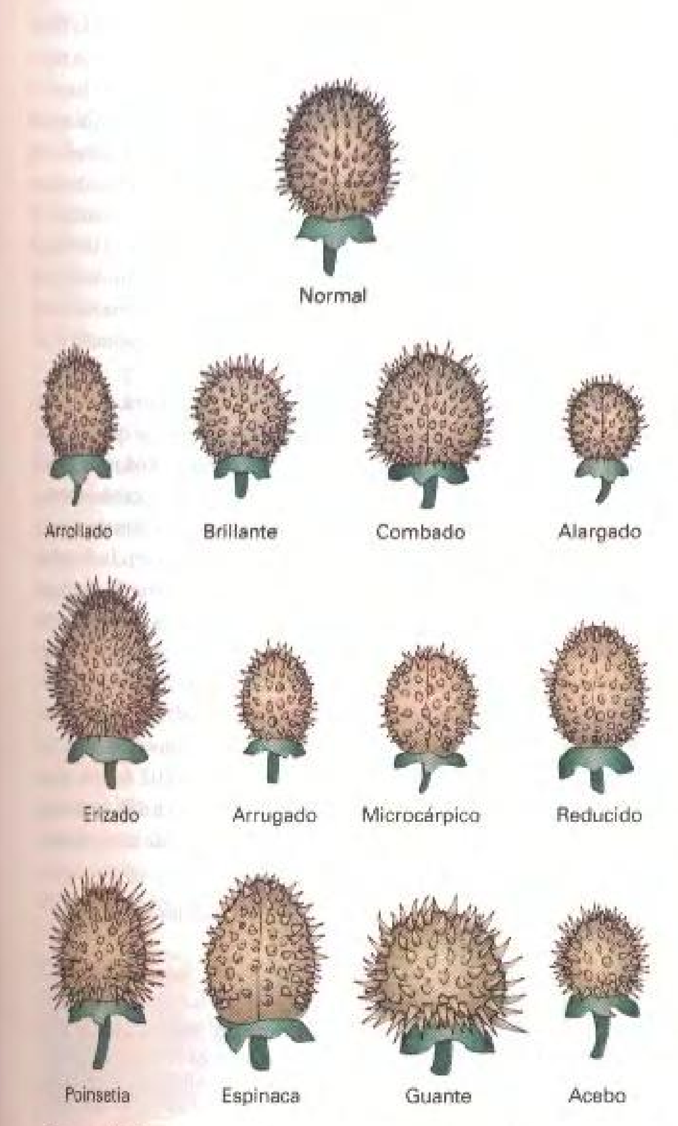


Figura 3-7. Frutos de plantas de *Datura*, cada una de ellas con un cromosoma extra distinto. Su aspecto característico indica que cada cromosoma es diferente de los demás. (De E. W. Sinnot, L. C. Dunn y T. Dobzhansky, *Principles of Genetics*, 5.ª ed., McGraw-Hill Book Company, Nueva York.)

ningún compañero. Carothers aprovechó estos cromosomas anormales como marcadores citológicos de la conducta de los cromosomas durante su segregación. En núcleos anafásicos, contó el número de veces que cada cromosoma del par heteromorfo migraba al mismo polo que el cromosoma sin compañero (Fig. 3-6). Observó que las dos alternativas posibles ocurrían con la misma frecuencia. Aunque estos cromosomas anormales no son ciertamente típicos, los resultados sugerían que los cromosomas no homólogos se distribuyen de manera independiente.

Otros investigadores sostenían que todos los cromosomas tenían la misma estructura fibrosa, sin que se detectaran diferencias cualitativas entre ellos. Ello sugería que todos los cromosomas están hechos del mismo material. Merece la pena introducir el análisis que contrarresta este argumento, en su secuencia histórica. En 1922, Alfred Blakeslee realizó un estudio de los cromosomas del estramonio (*Datura stramonium*), que tiene 12 pares de cromosomas. Obtuvo doce variedades diferentes, cada una de las cuales tenía los 12 pares de cromosomas normales más un cromosoma extra de un par determinado. Blakeslee observó que cada variedad era fenotípicamente distinta de las otras (Fig. 3-7). Este no sería el resultado esperado si fueran iguales todos los cromosomas no homólogos.

Todos estos hallazgos indicaban que la conducta de los cromosomas se corresponde estrechamente con la de los genes. Desde luego, ello hacía atractiva la teoría de Sutton-Boveri, pero hasta la fecha no existían pruebas concluyentes de que los genes estuvieran situados en los cromosomas. El razonamiento estaba simplemente basado en correlaciones. No obstante, nuevas observaciones aportarían tales pruebas, que aparecieron con el descubrimiento del ligamiento al sexo.

Descubrimiento del ligamiento al sexo

En los trabajos analizados hasta ahora, sin importar cuál fuera el sexo del parental de una u otra variedad en estudio, los cruzamientos recíprocos producían el mismo resultado, tal y como había demostrado Mendel. L. Doncaster y G. H. Raynor descubrieron la primera excepción a esta situación en 1906. Estudiaban el color del ala de un tipo de mariposa (*Abraxas*), empleando dos líneas diferentes: una con alas claras y otra con alas oscuras. Si se cruzan hembras de alas claras con machos de alas oscuras, todos los descendientes tienen alas oscuras, indicando que el alelo para el color claro es recesivo. Sin embargo, en el cruzamiento recíproco (hembra de alas oscuras × macho de alas claras), todas las hembras descendientes tienen alas claras y todos los machos descendientes tienen alas oscuras. Por tanto, este par de cruzamientos recíprocos no da resultados similares, y el fenotipo del ala del segundo cruzamiento está condicionado por el sexo de la mariposa. Observe que las hembras descendientes de este segundo cruzamiento son fenotípicamente similares a su padre, igual que los machos son similares a su madre. Consideremos otro ejemplo similar.

William Bateson estudiaba la herencia del tipo de pluma de los pollos. Una línea tenía plumas que alternaban bandas de color claro y oscuro, fenotipo conocido como listado. Otra línea, no listada, tenía plumas coloreadas de modo uniforme. En el cruce de machos listados con hembras no listadas, todos los descendientes eran listados, demostrándose así que el alelo no lista-

do es recesivo. Sin embargo, el cruzamiento recíproco (hembra listada con macho no listado) dio lugar a machos listados y hembras no listadas. De nuevo, el resultado es que la descendencia femenina desarrolla el fenotipo del padre y la descendencia masculina el de la madre.

La explicación de estos resultados vino del laboratorio de Thomas Hunt Morgan, quien en 1909 había empezado a estudiar el fenómeno de la herencia en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). El ciclo de vida de *Drosophila* es el típico de muchos insectos. Las moscas crecen vigorosamente en el laboratorio. La elección de *Drosophila* como organismo de estudio fue muy afortunada para los genetistas, y especialmente para Morgan, cuyo trabajo le valió el Premio Nobel en 1934.

El color normal del ojo de *Drosophila* es el rojo. En sus primeros estudios, Morgan descubrió un macho de ojos completamente blancos (véase Fig. 2-14). Encontró las diferencias en lo s cruzamientos recíprocos y la relación entre las proporciones fenotípicas de los dos sexos de la descendencia que se describieron en el Capítulo 2. Esto es muy parecido a los resultados obtenidos con pollos y mariposas, pero existe una diferencia importante: en los pollos y las mariposas, los descendientes son como el parental de sexo contrario si quien llevaba los alelos recesivos era el parental macho; en cambio, en los cruzamientos con *Drosophila*, tal resultado aparece si la portadora de los alelos recesivos es la hembra parental.

Antes de volver a la explicación de Morgan de los resultados con *Drosophila*, hemos de fijarnos en los datos citológicos que pudo utilizar en sus interpretaciones. En 1891, H. Henking, trabajando con machos de una especie de himenópteros, observó que los núcleos meióticos tenían 11 pares de cromosomas y un elemento no apareado que se movía hacia uno de los polos en la primera división meiótica. Henking denominó a este elemento no apareado «cuerpo X». Creyó que era un nucléolo, aunque estudios posteriores demostraron que se trataba de un cromosoma. Elementos no apareados, similares a éste, se encontraron después en otras especies. En 1905, Edmon Wilson advirtió que las hembras de *Protenor* (otro himenóptero) tienen seis pares de cromosomas, mientras que los machos tienen sólo cinco pares y un cromosoma no apareado, al que Wilson llamó (por analogía) el cromosoma X. Las hembras, en realidad, tienen un par de cromosomas X.

También en 1905, Nettie Stevens observó que machos y hembras del escarabajo *Tenebrio* poseen el mismo número de cromosomas, pero una de las parejas de cromosomas es heteromorfa en el macho. Un miembro de la pareja heteromorfa parece

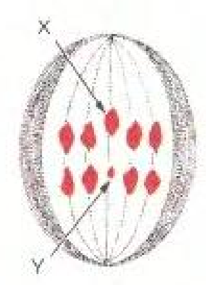


Figura 3-8. Segregación del par heteromorfo (X e Y) durante la meiosis de un macho de *Tenebrio*. En anafase I, los cromosomas X e Y son arrastrados hacia polos opuestos. (De A. M. Srb, R. D. Owen y R. S. Edgar, *General Genetics*, 2.ª ed. Copyright © 1965 por W. H. Freeman and Company.)

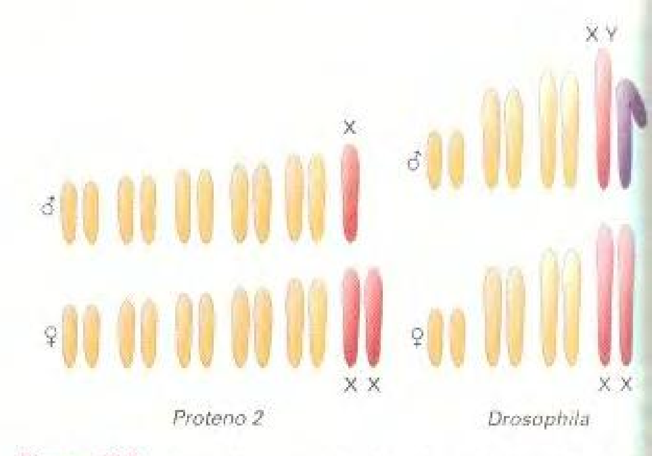


Figura 3-9. Dotación cromosómica de machos y hembras de dos espec[ies] de insectos distintas.

idéntico a los miembros de una pareja cromosómica de la hem[bra]: Stevens lo llamó cromosoma *X*. El otro miembro de la par[e]ja heteromorfa no se observa nunca en las hembras: lo llamó éste el cromosoma *Y* (Fig. 3-8). Stevens observó una situaci[ón] similar en *Drosophila melanogaster*, que tiene cuatro parejas [de] cromosomas, siendo una de las parejas de los machos heter[o]morfa. La Figura 3-9 resume estas dos situaciones básicas: [el] cromosoma extra no apareado y el par heteromorfo. (Usted [se] estará preguntando sobre el macho de saltamontes estudiado p[or] Carothers, que tenía tanto una pareja heteromorfa como un cr[o]mosoma desapareado. Éste es un caso muy poco frecuente y [no] debemos preocuparnos por él ahora.)

Con esta información de base, Morgan elaboró una interpret[a]ción de sus datos genéticos. En primer lugar, parece que los cr[o]mosomas X e Y determinan el sexo de la mosca. Todas las hem[]bras de *Drosophila* tienen cuatro parejas de cromosom[as] mientras que todos los machos tienen tres parejas normales y u[na] pareja heteromorfa. Así pues, la meiosis produce en la hemb[ra] óvulos, cada uno de los cuales posee un cromosoma X. Aunq[ue] los cromosomas X e Y de los machos son heteromorfos, como [se] mencionó en el Capítulo 2, parecen aparearse y segregan co[mo] una pareja de homólogos (Fig. 3-10). Por tanto, la meiosis pr[o]duce en los machos dos tipos de espermatozoides, unos que ll[e]van el cromosoma X y otros que llevan el cromosoma Y.

Después, Morgan volvió al problema del color de los oj[os]. Propuso que los alelos para el color rojo o blanco están present[es] en el cromosoma X, pero no hay un gen equivalente en el crom[osoma]

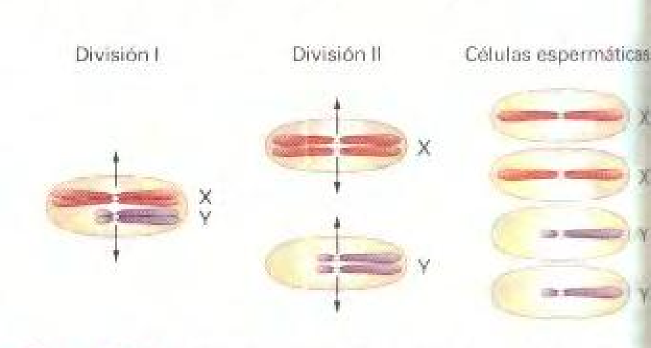


Figura 3-10. Apareamiento meiótico y distribución de los cromosomas X [e] Y en el mismo número de células espermáticas.

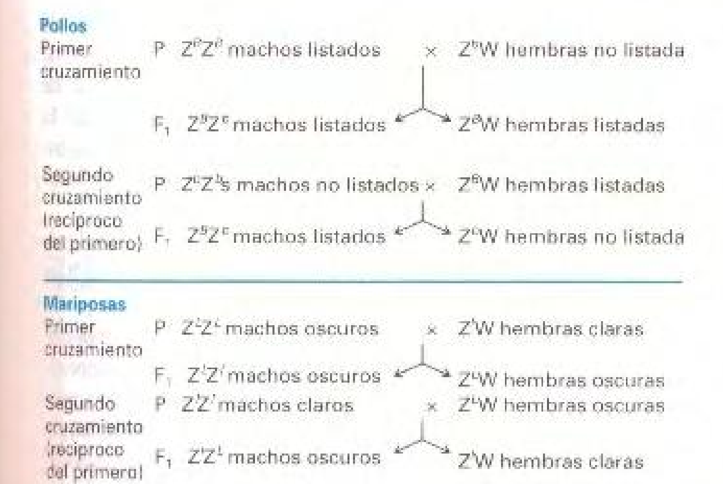


Figura 3-11. Forma de herencia de genes situados en los cromosomas sexuales de dos especies con el mecanismo de determinación sexual WZ.

soma Y. De modo que las hembras tendrían dos copias de este gen, mientras que los machos sólo una. Los resultados genéticos eran completamente consistentes con el comportamiento meiótico conocido de los cromosomas X e Y (como se describe en el Capítulo 2). Este experimento apoya firmemente la idea de que los genes se encuentran localizados en los cromosomas. No obstante, de nuevo es sólo una correlación y no constituye una prueba definitiva de la teoría de Sutton-Boveri.

¿Puede aplicarse la teoría de los cromosomas XX y XY a los resultados de los cruzamientos anteriores realizados con pollos y mariposas? En principio, cabría suponer que no. Sin embargo, Richard Goldschmidt se dio cuenta de inmediato que esos resultados podrían explicarse mediante una hipótesis parecida, suponiendo simplemente que los *machos* son en estos casos los portadores de la pareja de cromosomas idénticos, mientras que las hembras llevan la pareja heteromorfa. Para distinguir esta situación de la situación XY de *Drosophila*, Morgan propuso que los cromosomas sexuales del pollo y de la mariposa se denominaran W y Z, siendo los machos ZZ y las hembras WZ. De modo que cuando los genes de los cruzamientos entre pollos y entre mariposas están en el cromosoma Z, éstos pueden esquematizarse como en la Figura 3-11. Esta interpretación es consistente con los datos genéticos. En este caso, los datos citológicos confirmaron la hipótesis genética. En 1914, J. Seiler comprobó que ambos cromosomas son iguales en todas las parejas del macho de la mariposa, mientras que las hembras tienen una pareja heteromorfa.

COROLARIO

La forma peculiar de herencia que muestran ciertos genes hace muy probable que estén localizados en los cromosomas sexuales, los cuales muestran una forma de herencia paralela a la de aquéllos.

Una aclaración sobre símbolos genéticos

Con el propósito de definir los alelos variantes en relación al alelo «normal», se estableció una simbología especial en *Drosophila*. Este sistema es de amplio uso entre los genetistas y resulta de especial utilidad para el análisis genético. El alelo para la forma del carácter más frecuente en las poblaciones naturales de *Drosophila* (o, alternativamente, el alelo que se encuentra en la colección estándar del laboratorio) se designa alelo estándar o **silvestre**. Todos los alelos restantes son, por tanto, alelos mutantes. La designación simbólica de un gen deriva del primer alelo mutante encontrado. En los experimentos de Morgan con *Drosophila*, dicho alelo fue el de ojos blancos, representado por *w*. El silvestre correspondiente se representa, por convención, añadiendo un superíndice de signo positivo; de modo que el alelo normal que determina ojos rojos se denota w^+.

En caso de un polimorfismo, varios alelos son frecuentes en la naturaleza y todos pueden considerarse como silvestres. En este caso, se emplean superíndices para distinguir unos alelos de otros. Por ejemplo, dos alelos naturales del gen de la enzima alcohol deshidrogenasa de *Drosophila* muestran dimorfismo. Estas dos formas de la enzima migran a distinta velocidad en un gel de electroforesis. Los alelos que determinan esas isoformas se designan Adh^F (del inglés, *fast*) y Adh^S (*slow*).

El alelo silvestre *puede ser dominante o recesivo* con respecto a un alelo mutante. El empleo de letras minúsculas para designar los dos alelos w^+ y *w* indica que el alelo silvestre es dominante sobre el de ojos blancos (es decir, *w* es recesivo frente a w^+). Poniendo otro ejemplo, la condición silvestre del ala de la mosca es tersa y plana, y el alelo mutante provoca que el ala sea retorcida. Como este alelo es dominante sobre el alelo silvestre, se escribe *Cy* (del inglés, *Curly*), mientras que el alelo silvestre se escribe Cy^+. Observe que la letra mayúscula indica en este caso que *Cy* es dominante sobre Cy^+. (Observe también en estos ejemplos que el símbolo de un gen puede consistir en más de una letra.)

Una prueba definitiva de la teoría cromosómica

El paralelismo entre el comportamiento de los genes y el de los cromosomas hacía muy verosímil la idea de que los genes forman parte de los cromosomas. Pero esto no era una prueba de la teoría cromosómica y el debate continuó. La prueba crucial fue aportada por uno de los estudiantes de Morgan, Calvin Bridges. El trabajo de Bridges comenzó con un cruzamiento de la mosca de la fruta al que nos hemos referido antes. Si las letras X e Y representan los cromosomas X e Y, podemos escribir los genotipos parentales mediante los símbolos $X^w X^w$ (ojos blancos) × X^{w+} Y (ojos rojos). Sabemos que la descendencia esperada es $X^{w+} X^w$ (hembras de ojos rojos) y X^w Y (machos de ojos blancos). Cuando Bridges repitió el cruzamiento a gran escala, observó unas pocas excepciones entre la descendencia. Alrededor de uno de cada 2000 individuos de la F_1 eran hembras de ojos blancos o machos de ojos rojos. Estos individuos se denominaron, en conjunto, como *descendencia excepcional primaria*. Todos los machos excepcionales de este conjunto resultaron ser estériles. Sin embargo, cuando Bridges cruzó las hembras excepcionales primarias, de ojos blancos, con machos normales de ojos rojos, se observó, además de la descendencia esperada de hembras de ojos rojos y machos de ojos blancos, una proporción mayor de descendencia excepcional, 4 % de hembras de ojos blancos y machos de ojos rojos que eran fértiles. Esta descendencia excep-

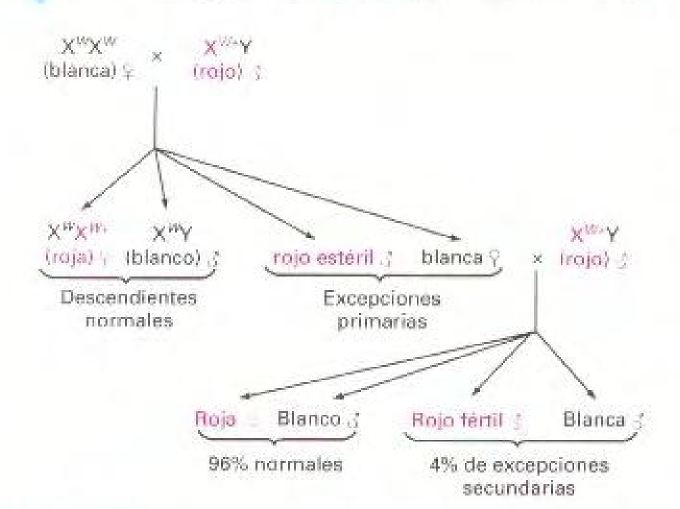


Figura 3-12. Cruzamientos con moscas *Drosophila* en los que se obtuvieron originalmente descendientes excepcionales primarios y secundarios. *Rojo*, mosca de ojos rojos; *blanco*, mosca de ojos blancos.

cional de madres excepcionales primarias se llamó *descendencia excepcional secundaria* (Fig. 3-12). ¿Cómo explicó Bridges estos descendientes excepcionales?

Las hembras excepcionales (que, como todas las hembras, contienen dos cromosomas X), han de recibir estos dos cromosomas de su madre, ya que son homocigóticas para *w*. De modo similar, los machos excepcionales deben haber recibido el cromosoma X de sus padres puesto que son w^+. Bridges pensó que podrían producirse fallos durante la meiosis de la hembra, de manera que los cromosomas X apareados no se separaran, bien en la primera o bien en la segunda división. Ello daría como resultado núcleos meióticos que tendrían dos cromosomas X, o ninguno en absoluto. Este fallo en la separación de los cromosomas se denomina **no disyunción**. La fecundación de óvulos portadores de estos tipos de núcleos con espermatozoides de un macho silvestre producirá cuatro clases de cigotos (Fig. 3-13). Es importante señalar que la barra que representa a un cromosoma en este esquema no indica un cromosoma sencillo, sino un par de cromátidas hijas.

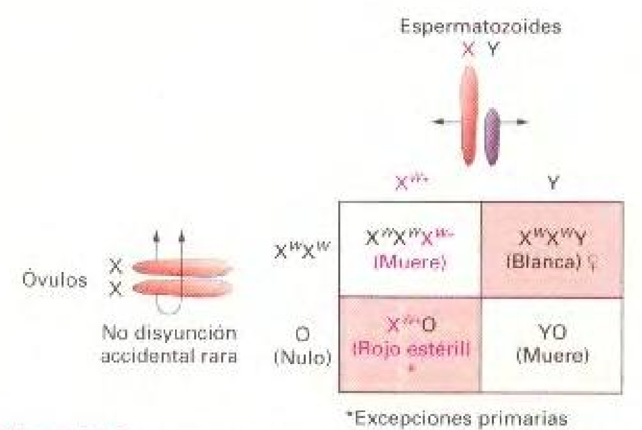


Figura 3-13. Explicación propuesta para dar cuenta de la descendencia excepcional primaria por no disyunción de los cromosomas X en la hembra parental. *Rojo*, mosca de ojos rojos. *blanco*, mosca de ojos blancos.

Bridges supuso que los cigotos XXX e YO morían antes de completar su desarrollo, de modo que se esperarían dos tipos de descendientes excepcionales, que serían X^wX^wY (hembras de ojos blancos) y $X^{w+}O$ (machos de ojos rojos). ¿Qué hay de la esterilidad de los machos excepcionales primarios? Tendría sentido, si suponemos que es necesaria la presencia de un cromosoma Y para la fertilidad de los machos.

En resumen, Bridges explicó la descendencia excepcional primaria postulando que meiosis aberrantes daban lugar, con baja frecuencia, a hembras XXY viables y machos XO. Comprobó este modelo de distintos modos. En primer lugar, examinó microscópicamente los cromosomas de la descendencia excepcional primaria y, efectivamente, eran XXY e XO, como había predicho. En segundo lugar, siguió prediciendo los apareamientos cromosómicos posibles durante la meiosis de las hembras XXY y, a partir de tales apareamientos, la naturaleza de la descendencia excepcional secundaria que surgía de ellos. De nuevo, el microscopio corroboró que todas sus predicciones eran correctas. Por tanto, asumiendo que el gen del color de los ojos se localizaba en el cromosoma, predijo de forma precisa la naturaleza de varios procesos genéticos anormales.

COROLARIO

La teoría de la localización cromosómica de los genes quedó establecida, sin ninguna sombra de duda, cuando Bridges empleó dicha teoría para predecir, con éxito completo, el resultado de determinados análisis genéticos.

La genética mendeliana en los ciclos de vida eucarióticos

Hasta ahora, hemos hablado principalmente de organismos diploides (organismos con dos dotaciones homólogas de cromosomas en cada célula). Como hemos visto, los diploides se designan $2n$, donde n corresponde al número de cromosomas en cada dotación cromosómica. Por ejemplo, las células del guisante contienen dos dotaciones de siete cromosomas, así que en este caso $2n = 14$. Los organismos que nos encontramos con más frecuencia en nuestra vida diaria (los animales y las plantas con flor) son diploides en la mayoría de sus tejidos.

No obstante, una gran proporción de la biomasa terrestre está constituida por organismos que pasan la mayor parte de su ciclo de vida en forma haploide, en la que cada célula contiene sólo una dotación de cromosomas. Algunos ejemplos significativos son los hongos y las algas. Las bacterias pueden considerarse haploides, pero constituyen un caso especial, ya que carecen de cromosomas del tipo de los que hemos descrito (El ciclo de vida de las bacterias se describe en el Capítulo 7). Igualmente importantes son aquellos organismos que pasan una parte de su ciclo de vida en forma haploide y otra parte en forma diploide. De tales organismos se dice que muestran **alternancia de generaciones**, en referencia al paso continuo de una fase $2n$ a otra n, y viceversa. De hecho, todas las plantas muestran alternancia de generaciones. No obstante, el estado haploide de las plantas con flor y las coníferas es poco vistoso y dependiente de la parte

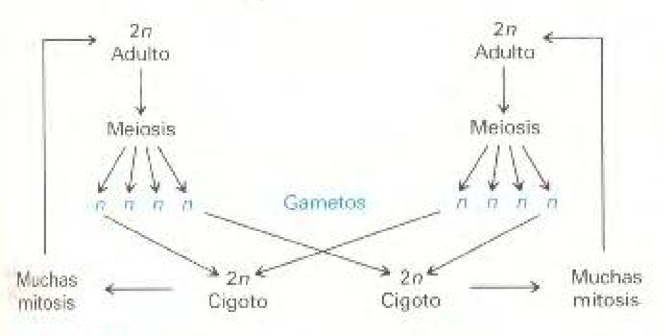


Figura 3-14. Ciclo de vida de un organismo diploide.

diploide de la planta, apareciendo como una estructura especial. En otras plantas, como los musgos y los helechos, el estado haploide sí aparece como una forma de vida independiente.

¿Presentan genética mendeliana todos estos ciclos de vida? La contestación es que el patrón de herencia mendeliana se da en cualquier organismo en cuyo ciclo de vida aparezca la meiosis, ya que las leyes de Mendel se basan en dicho proceso. Todos los grupos de organismos mencionados, excepto las bacterias, utilizan la meiosis como parte de su ciclo de vida.

Diploides

La Figura 3-14 resume de manera muy esquemática el ciclo diploide, que es el ciclo de la mayoría de los animales (incluyendo a la especie humana). El organismo adulto está constituido por células diploides, y la meiosis tiene lugar en células diploides especializadas, los meiocitos, los cuales se encuentran en las gónadas (testículos y ovarios). Los productos de la meiosis son los gametos (óvulos y espermatozoides). La fusión de los gametos haploides da lugar a un cigoto diploide que, mediante mitosis, genera un organismo multicelular.

En la Figura 3-15, se muestra la meiosis de un organismo dihíbrido. El genotipo de la célula es *A*/*a* ; *B*/*b*, y se muestran los dos pares de alelos, *A*/*a* y *B*/*b*, en dos parejas de cromosomas distintos. Esta célula hipotética contiene cuatro cromosomas: un par de homólogos largos y un par de homólogos cortos. Las diferencias de tamaños entre distintos pares de cromosomas son frecuentes.

En la Figura 3-15, las partes 4 y 4' indican dos patrones distintos de segregación de alelos producidos por uniones diferentes del huso acromático a los centrómeros que se dan con igual frecuencia en la anafase I. La meiosis produce entonces cuatro cé-

Interfase. Cromosomas no apareados.

Profase. Los cromosomas y los centrómeros ya se han replicado, pero los centrómeros no se han separado.

Profase. Sinapsis de cromosomas homólogos.

Anafase. Los centrómeros, unidos a las fibras del huso, son atraídos hacia los polos de la célula.

El otro tipo de combinación de alelos, de igual frecuencia que el primero.

Telofase. Se forman dos células.

Anafase segunda. Se forman nuevos husos y los centrómeros finalmente se separan.

Fin del proceso. En cada meiosis se producen cuatro células.

Figura 3-15. Meiosis en una célula diploide de genotipo *A*/*a* ; *B*/*b*. Se muestra cómo la segregación y la distribución al azar de diferentes parejas cromosómicas genera la razón gamética mendeliana 1:1:1:1.

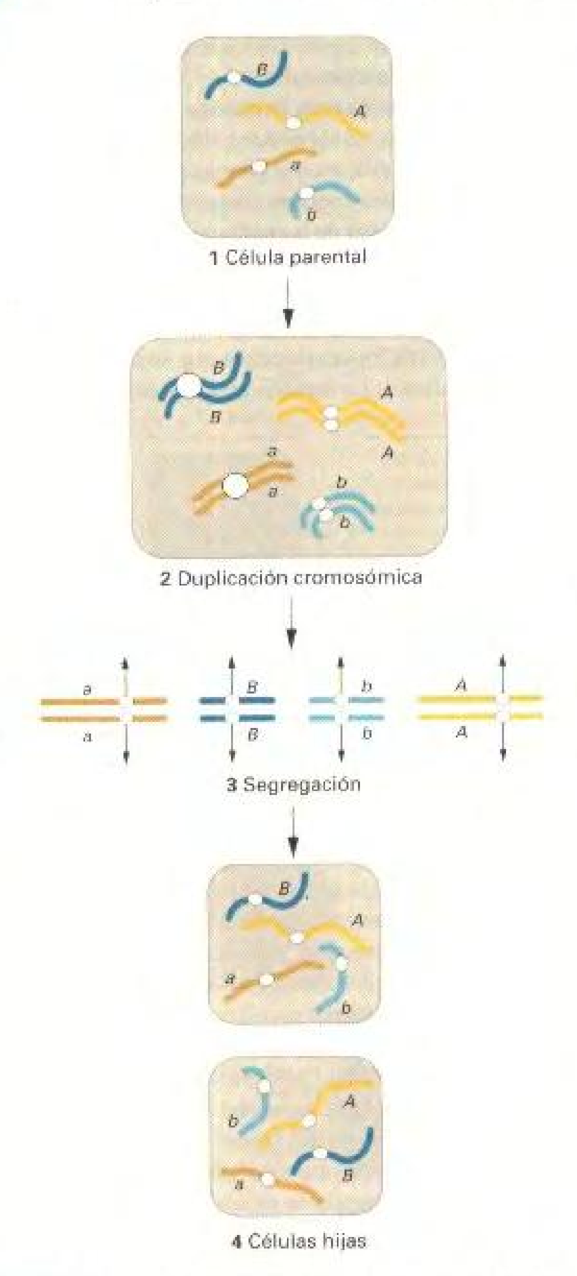


Figura 3-16. Mitosis de una célula diploide de genotipo *A/a* ; *B/b*. Cada gen heterocigótico se encuentra en un par cromosómico distinto.

lulas con los genotipos indicados en cada uno de los patrones de segregación. Puesto que los patrones de segregación 4 y 4′ son igualmente frecuentes, los productos meióticos celulares de genotipos *A* ; *B*, *a* ; *b*, *A* ; *b*, y *a* ; *B* se producen con la misma frecuencia. En otras palabras, la frecuencia de cada uno de estos cuatro genotipos es $\frac{1}{4}$. Esta distribución gamética es igual que la postulada por Mendel para un cruzamiento dihíbrido, y es la que insertamos en un extremo del diagrama de Punnett. La fusión al azar de estos gametos da lugar a la propoción fenotípica 9:3:3:1 en la F_2.

El diagrama de la Figura 3-15 muestra exactamente cómo la conducta de los cromosomas da lugar a las proporciones mendelianas. Observe que la primera ley de Mendel (de la distribución igualitaria) describe lo que le ocurre a un par de alelos cuando la

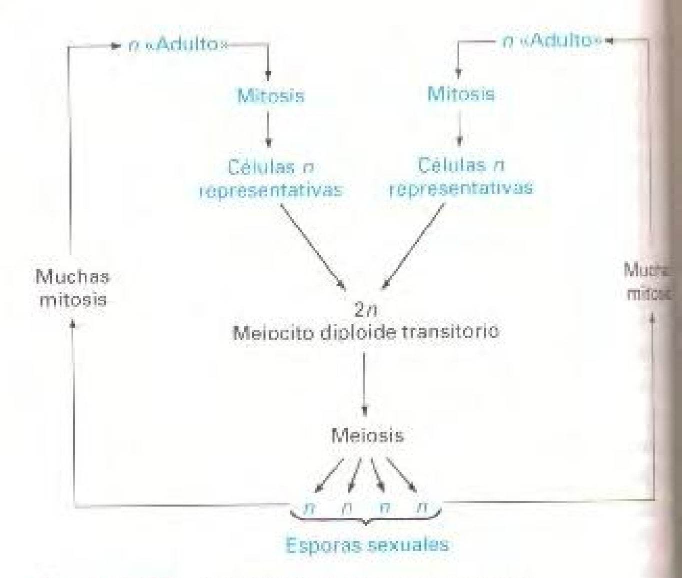


Figura 3-17. Ciclo de vida de un organismo haploide.

pareja de homólogos portadores de ellos se van a células distintas durante la primera división meiótica. Observe también que la segunda ley de Mendel (de la segregación independiente) es el resultado de la distribución independiente de cada pareja de cromosomas homólogos. La Figura 3-16 muestra la mitosis en el mismo individuo dihíbrido.

Haploides

La Figura 3-17 muestra un ciclo haploide básico. En este caso, el propio organismo es haploide. ¿Cómo puede producirse la meiosis en un organismo haploide? Después de todo, la meiosis supone el apareamiento de las dos dotaciones de cromosomas homólogos. La respuesta es que todos los organismos haploides que poseen meiosis pasan por un estado diploide transitorio que proporciona los meiocitos. En algunos casos, como en la levadura, se fusionan dos individuos adultos unicelulares haploides para producir un meiocito diploide que realiza entonces la meiosis. En otros casos, se fusionan células especializadas de distintos parentales para dar lugar a los meiocitos. Observe que estas células que se fusionan se llaman, apropiadamente, gametos, así que podemos ver que, en este caso, los gametos se producen por mitosis. Como es usual, la meiosis genera productos haploides, que se denominan **esporas sexuales**. En algunas especies, las esporas sexuales se convierten en adultos unicelulares; en otras, generan un individuo multicelular haploide, mediante mitosis sucesivas. Observe que un cruzamiento entre dos organismos haploides adultos supone una sola meiosis, mientras que el cruzamiento entre dos organismos diploides requiere una meiosis en cada progenitor. Como veremos después, esta simplicidad hace de los haploides unos organismos muy atractivos para el análisis genético. La mitosis en los haploides tiene lugar como se muestra en la Figura 3-18.

Analicemos un cruzamiento en un haploide concreto. Un organismo adecuado es *Neurospora crassa*, el hongo anaranjado del pan. Se trata de un organismo multicelular, en el cual las células se unen por sus extremos para formar cadenas de células

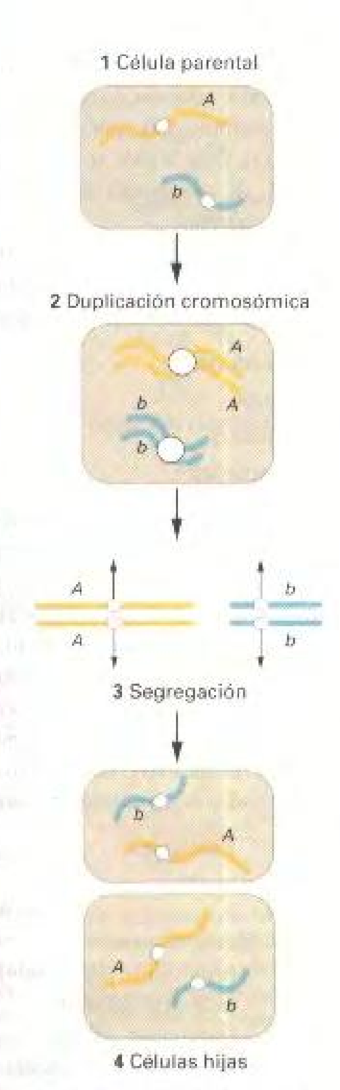


Figura 3-18. Mitosis en una célula haploide de genotipo *A* ; *b*. Cada gen se encuentra en un cromosoma distinto.

o hifas. Las hifas penetran por el sustrato y también envían ramas aéreas que contienen unas células llamadas **conidios** (las esporas asexuales). Éstos se desprenden y dispersan para formar nuevas colonias o, alternativamente, actúan como gametos masculinos, fundiéndose con la estructura materna de un individuo distinto (Fig. 3-19), que ha de ser de un **tipo sexual** opuesto. En los hongos no existen sexos verdaderos y todos los cultivos haploides se desarrollan de forma similar. No obstante, las poblaciones contienen tipos sexuales distintos determinados genéticamente. En *Neurospora*, hay dos tipos sexuales denominados *A* y *a*, y la fase meiótica (o sexual) del ciclo de vida puede tener lugar sólo si se unen dos individuos haploides de tipo sexual distinto. Los tipos sexuales pueden considerarse como «sexos fisiológicos». Aunque esta definición no es del todo apropiada, resulta útil para enfatizar las diferencias no observables que se dan entre los dos tipos sexuales.

El gameto femenino queda dentro de un nudo especializado de hifas. Su núcleo haploide se empareja luego con un núcleo haploide masculino, sufriendo ambos varias divisiones mitóticas que dan lugar a numerosas parejas de núcleos. Los dos núcleos de cada pareja se fusionan al final para formar los meiocitos diploides. Entonces tiene lugar la meiosis, generándose en cada meiocito cuatro núcleos haploides, que representan los cuatro productos meióticos. Por motivos desconocidos, los cuatro núcleos se dividen mitóticamente, dando como resultado ocho núcleos, que se convierten en ocho esporas sexuales con forma de balón de rugby, denominadas **ascosporas**. Las ascosporas son expulsadas desde un cuerpo fructífero con forma de botella, desarrollado a partir del nudo de hifas que contenía inicialmente el gameto femenino. Las ascosporas se pueden recoger y sembrar por separado en tubos de ensayo, donde cada una de ellas da lugar, por mitosis, a un nuevo individuo (Fig. 3-20).

¿Qué características podemos analizar en este organismo? Una es la coloración de los conidios, de la que se encuentran

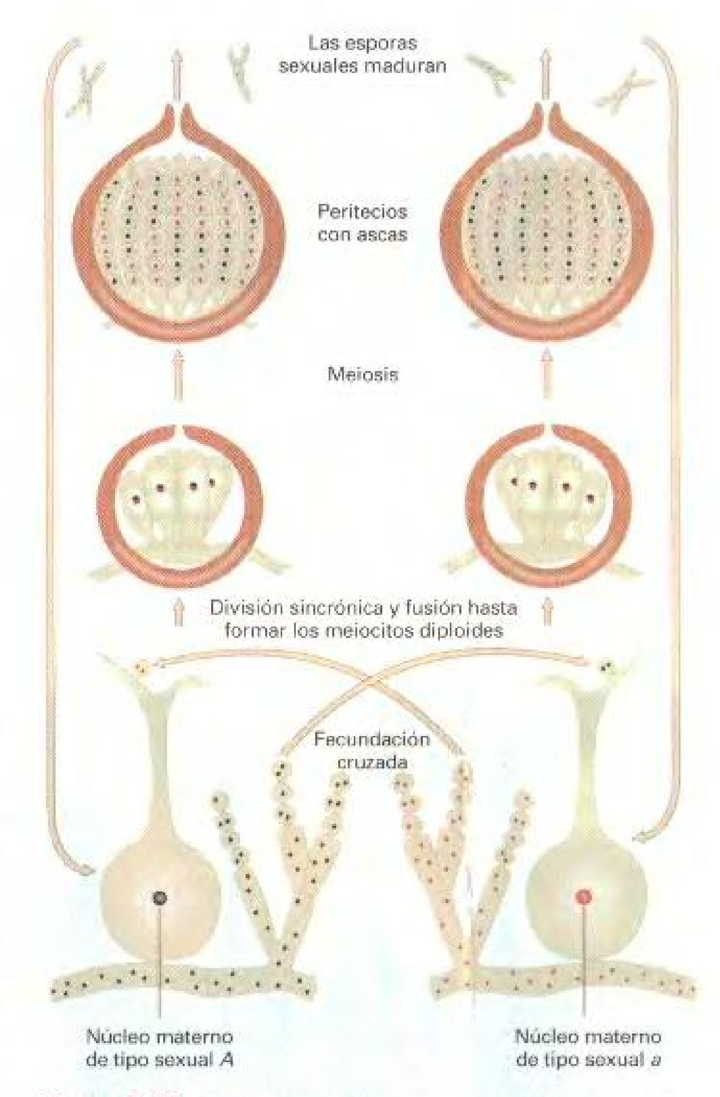
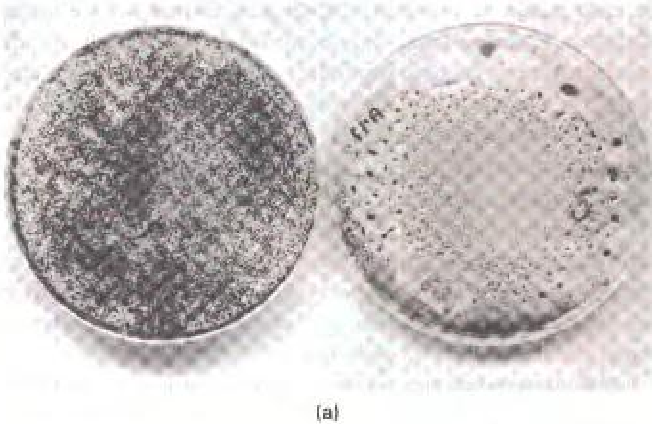
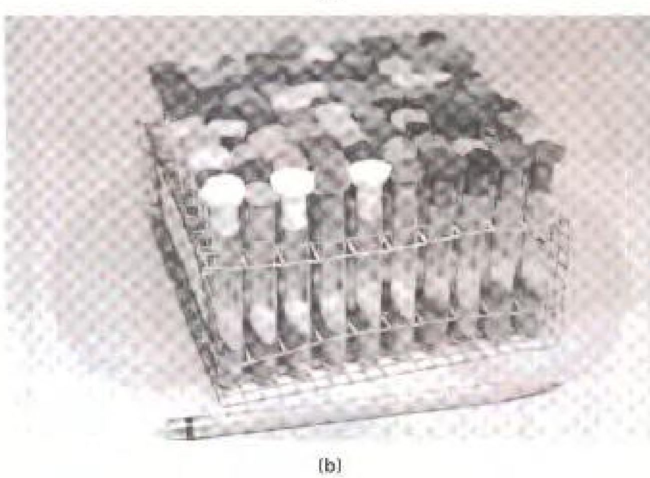


Figura 3-19. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*, el hongo anaranjado del pan. La autofecundación no es posible en esta especie: existen dos tipos sexuales, determinados por los alelos *A* y *a* de cierto gen. Un cruzamiento tendrá éxito sólo si es del tipo *A* × *a*. Una espora asexual del sexo opuesto se fusiona con un pelo receptivo, y un núcleo desciende a lo largo del pelo hasta emparejarse con un núcleo del nódulo de células. Los núcleos *A* y *a* se aparean, sufren entonces una serie de mitosis sincrónicas y, finalmente, se funden para formar los meiocitos diploides.



(a)



(b)

Figura 3-20. (a) Cruzamiento de *Neurospora* realizado en una placa de Petri (a la izquierda). Las numerosas esferas pequeñas de color negro son cuerpos fructíferos en los que se ha producido la meiosis; las ascosporas (esporas sexuales) fueron proyectadas y aparecen como una película fina de polvo sobre la humedad condensada en la tapa (que ha sido levantada y colocada boca arriba a la derecha de la placa de Petri). (b) Una gradilla de cultivos descendientes, producido cada uno de ellos a partir de una ascospora aislada. (Anthony Griffiths.)

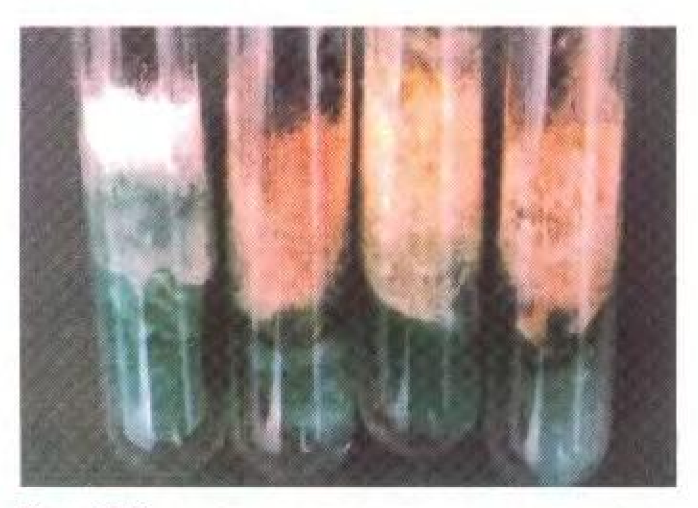


Figura 3-21. Variantes de color del hongo *Neurospora* determinadas genéticamente. El tipo silvestre, de color naranja, aparece a la derecha, junto a las variantes, empezando por la izquierda, albina, amarilla y marrón. Sus genotipos son: silvestre ($al^+ \cdot ylo^+ \cdot ad^+$), albino ($al \cdot ylo^+ \cdot ad^+$), amarillo ($al^+ \cdot ylo \cdot ad^+$) y marrón ($al^+ \cdot ylo^+ \cdot ad$). (Anthony Griffiths.)

variantes respecto al tipo silvestre anaranjado. La Figura 3-21 muestra un cultivo normal y cultivos de algunas de las variantes de color, incluyendo una albina. Otra posible característica es la morfología de las colonias, para la cual se conocen dos fenotipos diferentes, uno normal, de apariencia esponjosa, y otro más compacto, denominado colonial.

Si cruzamos un cultivo esponjoso y anaranjado con otro colonial y albino de tipo sexual contrario, y aislamos y cultivamos 100 ascosporas, encontraremos las siguientes proporciones de fenotipos:

25 % esponjosos y anaranjados

25 % coloniales y albinos

25 % esponjosos y albinos

25 % coloniales y anaranjados

En total, la mitad de la descendencia es esponjosa y la mitad colonial. Por tanto, esta diferencia fenotípica debe estar determinada por dos alelos de un mismo gen que han segregado igualitariamente en la meiosis. Podemos llamar a estos alelos col^+ (esponjoso) y col (colonial). Lo mismo es cierto para el otro carácter: la mitad son de color anaranjado y la otra mitad albinos, de modo que la diferencia fenotípica en el color está también determinada por una pareja de alelos, que podemos denominar al^+ (anaranjado) y al (albino). Los cultivos parentales y los cuatro tipos de descendientes pueden representarse como:

Parentales

$col^+ ; al^+$ × $col ; al$

(esponjoso, anaranjado) (colonial, albino)

Descendientes

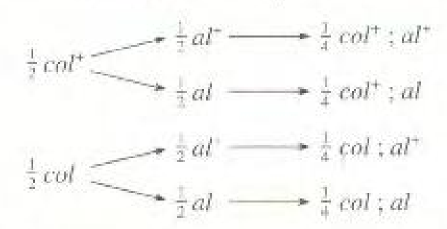
$col^+ ; al^+$ (esponjoso, anaranjado)

$col ; al$ (colonial, albino)

$col^+ ; al$ (esponjoso, albino)

$col ; al^+$ (colonial, anaranjado)

La proporción 1:1:1:1 es el resultado de la segregación independiente, como se muestra en el esquema ramificado siguiente:



Vemos, pues, que las leyes de Mendel son válidas incluso en un organismo tan sencillo como *Neurospora*.

Alternancia haploide/diploide

El ciclo de vida de un organismo con alternancia de generaciones consta de dos fases: una diploide y otra haploide. Generalmente, una de las fases es más prominente que la otra. De modo que, lo que todos reconocemos como una planta de helecho es el estado de **esporofito** diploide, fase en que tiene lugar la meiosis y se producen las esporas sexuales. No obstante, el organismo tiene otro estado independiente haploide, pequeño y fotosintético, más difícil de reconocer sobre el suelo del bosque, el **gametofito**. En el musgo, la planta verde es el estado haploide y el

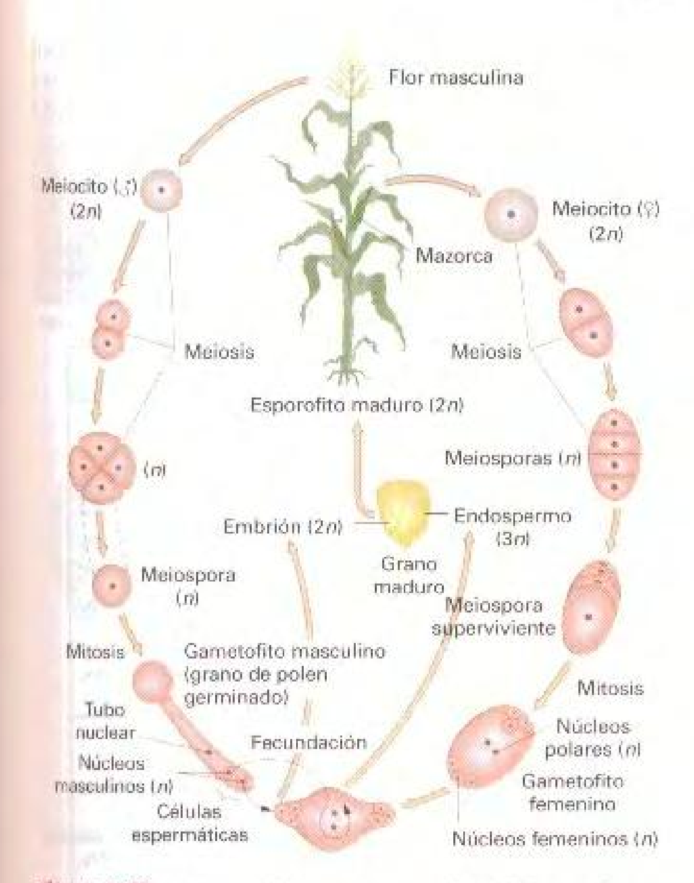


Figura 3-22. Alternancia de generaciones en el maíz. El gametofito masculino se desarrolla a partir de un meiocito del órgano correspondiente (borla superior). El gametofito femenino se produce a partir de un meiocito de la mazorca. Una célula espermática del gametofito masculino se fusiona con el núcleo ovular del gametofito femenino, formándose así un cigoto diploide que se desarrolla hasta formar un embrión. La otra célula espermática se funde con dos núcleos centrales del gametofito femenino, formándose una célula triploide (3n) que genera el tejido del endospermo que rodea al embrión. El endospermo constituye el alimento del embrión durante la germinación de la semilla. ¿Qué parte del esquema representa la fase haploide? ¿Qué parte representa la fase diploide?

tallo marrón que crece de la planta es un esporofito diploide independiente que, en realidad, vive parasitándola.

En las plantas con flor, la forma verde principal es el esporofito diploide. Los gametofitos haploides de las plantas con flor son extremadamente pequeños y dependientes de la forma diploide. Dichos gametofitos se encuentran en la flor. Cuando ocurre la meiosis en los meiocitos de la antera y el ovario, los productos haploides resultantes se llaman **esporas**. Las esporas sufren unas pocas divisiones mitóticas y generan un gametofito haploide multicelular pequeño. El gametofito masculino de las plantas con semilla es conocido como grano de polen. La Figura 3-22 muestra cómo en las plantas con flor, las células del gametofito actúan en la fecundación como óvulo o célula espermática. La Figura 3-23 muestra un esquema general del ciclo con alternancia de generaciones.

En musgos y helechos, las células espermáticas, que son muy móviles, deben desplazarse de un gametofito a otro, sobre una película de agua, para efectuar la fecundación. Veamos un posible cruzamiento a realizar con un musgo. El carácter a estudiar puede manifestarse en el gametofito o en el esporofito. Suponga

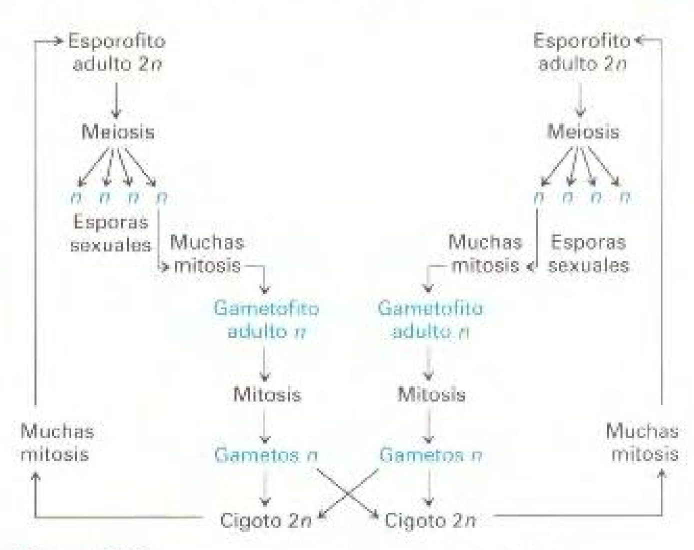


Figura 3-23. Alternancia de las fases diploide y haploide en el ciclo de vida de las plantas.

que tenemos un gen cuyos alelos afectan a las «hojas» del gametofito, siendo w un alelo que produce hojas de borde ondulado y w^- un alelo que produce hojas de borde liso. Suponga también que otro gen distinto afecta al color del esporofito, siendo r responsable del color rojo y r^+ de la coloración marrón normal. Fecundamos un gametofito de hojas lisas (portador, sin manifestarlo, del alelo r) con gametos masculinos de un gametofito de hojas de borde ondulado y portador de r^+ (Fig. 3-24). Por tanto, el cruzamiento es $w^- ; r \times w ; r^+$.

Sobre el propio gametofito, se desarrolla un esporofito diploide de genotipo $w^+/w ; r^+/r$ que resulta ser de color marrón (ya que el rojo es recesivo). Las células de este esporofito actúan como meiocitos, y se producen esporas sexuales (productos de la meiosis) en las siguientes proporciones:

25 % $w^+ ; r^+$
25 % $w^+ ; r$
25 % $w ; r^-$
25 % $w ; r$



Figura 3-24. Esquema de la herencia mendeliana en un cruzamiento hipotético en un musgo. Las alternativas w^+ o w se manifiestan sólo en la fase de gametofito haploide, mientras que r^+ o r se manifiestan sólo en la fase de esporofito diploide.

Sólo podremos observar el carácter de la hoja en estos gametofitos. Para averiguar qué individuos son r^+ y cuáles r, deberán realizarse los cruzamientos adecuados entre ellos.

De nuevo, las leyes de Mendel describen fielmente un fenómeno hereditario. Se trata, simplemente, de no perder de vista el grado de ploidía de cada fase del ciclo de vida y observar la aparición de proporciones mendelianas sencillas.

COROLARIO

Las leyes mendelianas son aplicables a los productos de meiosis de cualquier organismo, siendo su formulación general la siguiente:

1. **En la meiosis, los alelos de un gen se distribuyen igualitariamente entre los productos haploides resultantes.**
2. **En la meiosis, los alelos de un gen segregan de manera independiente de los alelos de otros gen[es] que están situados en pares cromosómicos distint[os].**

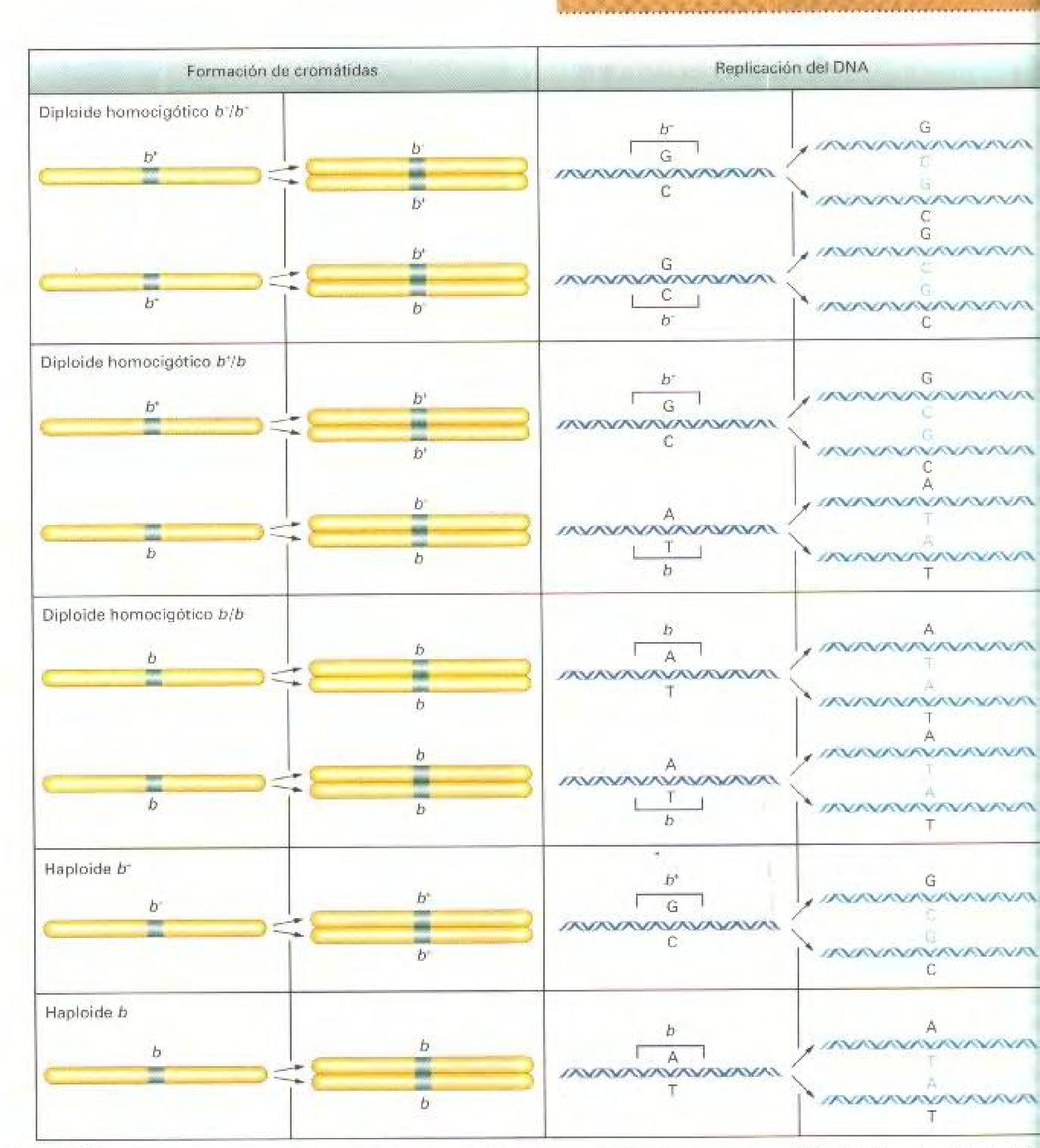


Figura 3-25. Relación entre la formación de cromátidas y la replicación subyacente del DNA. Se representan tres células diploides y dos células haploid[es] de genotipos diferentes. El alelo silvestre se denomina b^+ y su alelo mutante b. El alelo mutante b se ha formado por sustitución de un par de bases G C del tipo s[ilvestre] por un par de bases AT en el alelo mutante.

Bases moleculares de la mitosis y la meiosis

Sabemos que, a nivel genético, un cromosoma es una sola molécula de DNA. La célula y la división celular son posibles gracias a la replicación del DNA, que tiene lugar durante la fase S previa a la división. Dicha replicación genera dos cromátidas hermanas. La Figura 3-25 muestra la formación de las cromátidas a nivel del DNA. Los acontecimientos de mitosis y meiosis pueden representarse, a nivel del DNA, como muestra la Figura 3-26 para un individuo diploide heterocigótico.

La adhesión y el apareamiento de los cromosomas son también propiedades moleculares claves. Tanto en la mitosis como

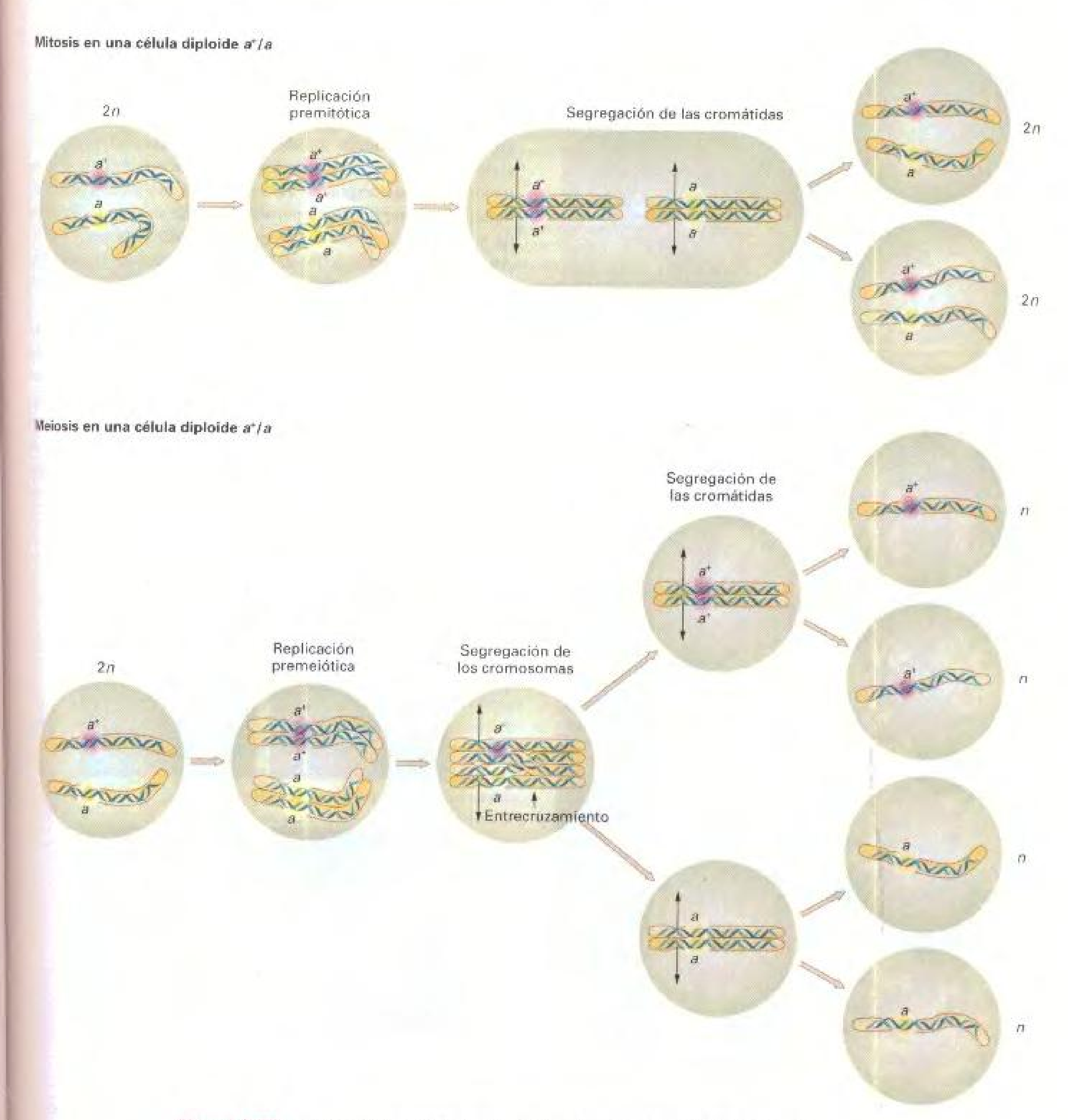


Figura 3-26. Representación simplificada de la mitosis y la meiosis al nivel del DNA. En ambos casos, se parte de una célula diploide de genotipo a^+/a.

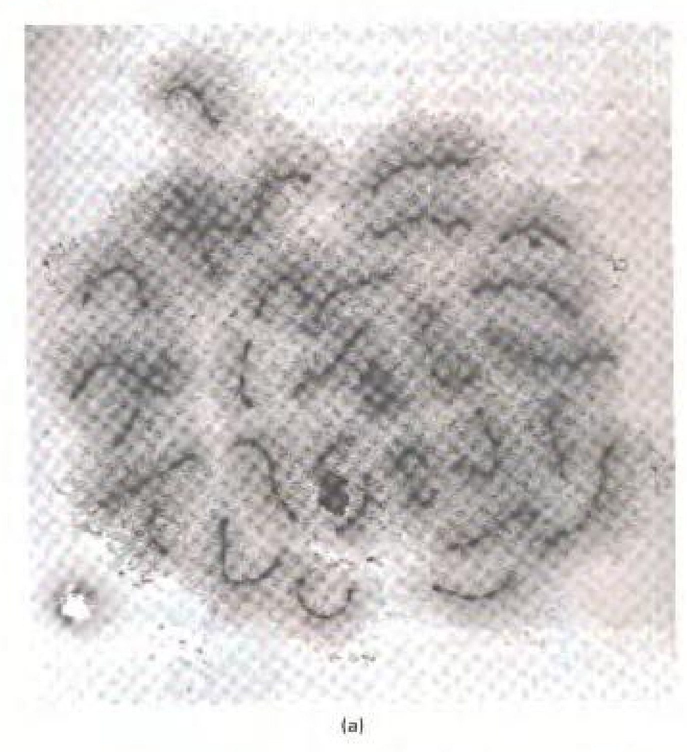




Figura 3-27. Complejo sinaptonémico. (a) En *Hyalophora cecropia*, un gusano de seda, el número cromosómico normal de los machos es 62, produciéndose 31 complejos sinaptonémicos. Uno de los cromosomas (*centro*) del individuo que se muestra aquí, está representado tres veces. Este tipo de cromosoma se denomina *trivalente*. El DNA está organizado en lazos regulares alrededor del complejo sinaptonémico. La estructura densa y negra es el nucléolo. (b) Complejo sinaptonémico normal de *Lilium tyrinum*. Observe (*a la derecha*) los dos elementos laterales del complejo sinaptonémico y observe también (*a la izquierda*) un cromosoma no apareado, mostrando el núcleo central correspondiente a uno de los elementos laterales (Por cortesía de Peter Moens.)

en la meiosis, las cromátidas hermanas se mantienen unidas a lo largo de su longitud hasta que se separan en la anafase de la mitosis o en la anafase II de la meiosis. La **adhesión de las cromátidas hermanas** se debe a unas proteínas adhesivas especiales. El emparejamiento de los cromosomas homólogos en la meiosis se consigue gracias a unos ensamblajes moleculares denominados **complejos sinaptonémicos**, que se sitúan a lo largo de y entre los cromosomas homólogos apareados (Fig. 3-27). Aunque la existencia de los complejos sinaptonémicos se conoce desde hace tiempo, el funcionamiento exacto de estas estructuras todavía se está estudiando.

Las fibras del huso acromático son las que proporcionan la fuerza motriz de la mitosis y la meiosis (Fig. 3-28). Durante la división nuclear, se forman las fibras del huso de manera que éste queda paralelo al eje de la célula y conecta ambos polos. Las fibras del huso están constituidas por polímeros de una proteína llamada tubulina. El centrómero del cromosoma es una secuencia específica de DNA que es esencial para el movimiento de las cromátidas durante la división celular. Cada centrómero actúa como un sitio de unión para un complejo multiproteico

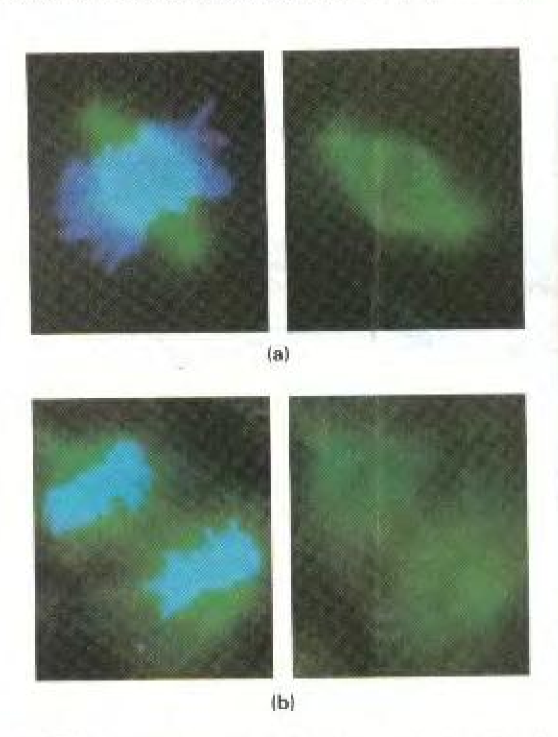


Figura 3-28. Marcado fluorescente del huso acromático (en verde) y de los cromosomas (en azul) durante la mitosis: (a) antes de que las cromátidas se separen; (b) durante la separación de las cromátidas. (De J. C. Waters, R. W. Cole y C. L. Rieder, *J. Cell Biol.* 122, 1993, 361. Cortesía de C. L. Rieder.)

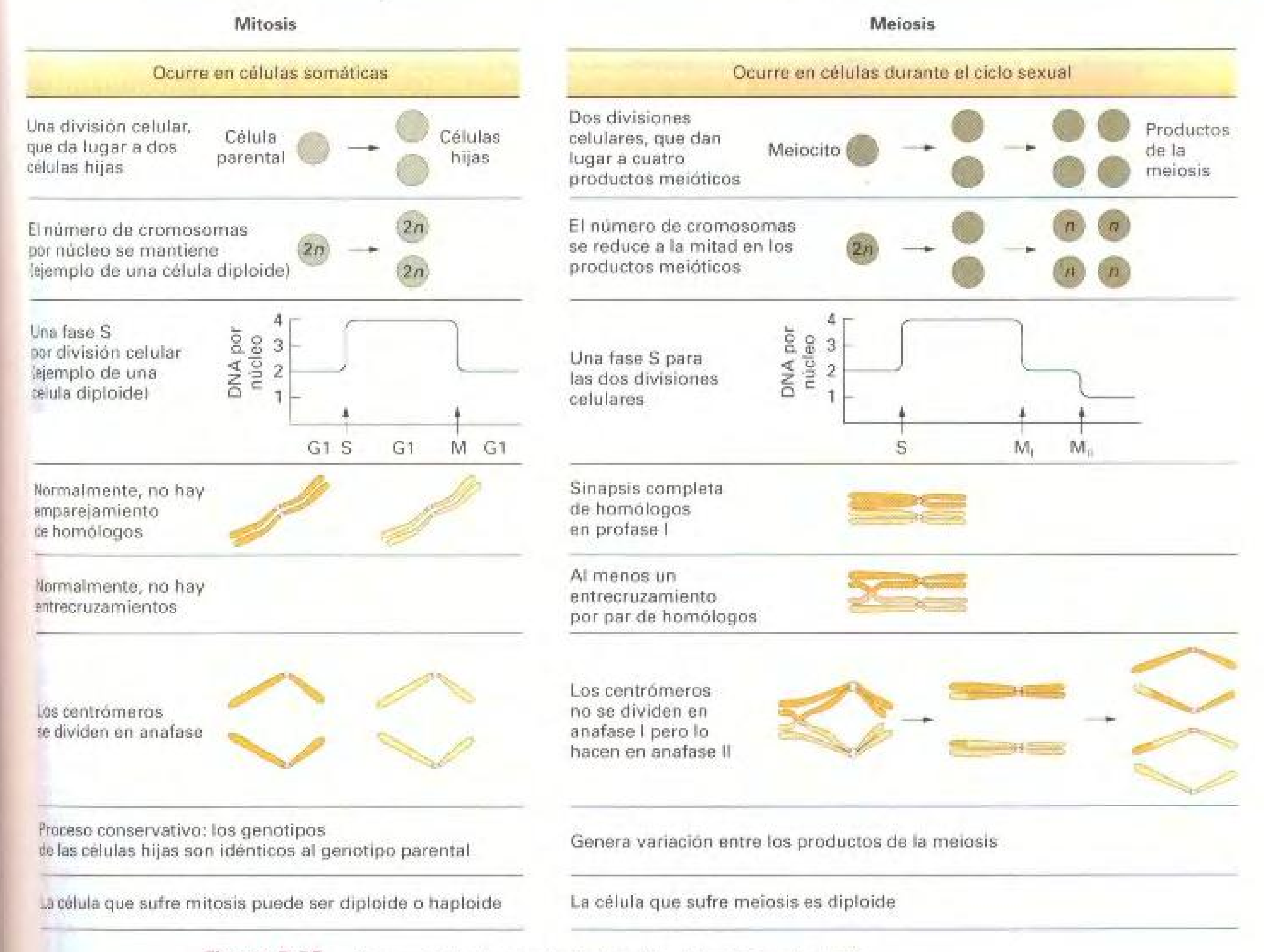


Figura 3-29. Comparación de los aspectos fundamentales de la mitosis y la meiosis.

denominado **cinetocoro**. A su vez, los cinetocoros funcionan como sitios de unión para los microtúbulos. Uno o varios microtúbulos de un polo se unen a un cinetocoro, y un número similar del polo opuesto se une al otro cinetocoro. Entonces, las fibras del huso tiran de las cromátidas hermanas hacia polos opuestos. El aparato del huso y los complejos cinetocoro-centrómero son, pues, los que determinan la fidelidad de la división nuclear.

En la Figura 3-29 se comparan los acontecimientos clave de la mitosis y la meiosis. En los próximos apartados, analizaremos en mayor profundidad cómo se estructura un cromosoma.

Topografía de la dotación cromosómica

Hasta ahora, hemos considerado los cromosomas como estructuras vermiformes que contienen DNA (por tanto, los genes). En realidad, los cromosomas varían mucho en su tamaño y forma, y poseen algunas características que ayudan a los citogenetistas a identificar en muchos casos cromosomas específicos. En este apartado, consideraremos las características que permiten distinguir una dotación cromosómica de otra, así como un determinado cromosoma de otro.

Número de cromosomas

Las distintas especies poseen un número de cromosomas característico. El Cuadro 3-1 muestra algunos ejemplos. El número de cromosomas se presenta en un intervalo muy amplio, que va desde dos cromosomas en algunas plantas con flor hasta varios centenares en ciertos helechos.

Tamaño cromosómico

Los cromosomas de un genoma concreto pueden diferir considerablemente en tamaño. En la especie humana, por ejemplo, hay una diferencia de cerca de cuatro veces entre el tamaño del cromosoma 1 (el mayor) y el del cromosoma 21 (el más pequeño), como se observa en el Cuadro 3-2. Al estudiar los cromosomas de una especie, los citogenetistas tienen dificultades para identificarlos únicamente por su tamaño, pero esta característica sí les

CUADRO 3-1. Número de pares de cromosomas de diferentes especies de plantas y animales

Nombre común	Especie	Número de pares de cromosomas	Nombre común	Especie	Número d pares de cromosoma
Mosquito	*Culex pipiens*	3	Trigo	*Triticum aestivum*	21
Mosca doméstica	*Musca domestica*	6	Hombre	*Homo sapiens*	23
Cebolla de jardinería	*Allium cepa*	8	Patata	*Solanum tuberosum*	24
Sapo	*Bufo americanus*	11	Vaca	*Bos taurus*	30
Arroz	*Oryza sativa*	12	Burro	*Equus asinus*	31
Rana	*Rana pipiens*	13	Caballo	*Equus caballus*	32
Caimán	*Alligator mississipiensis*	16	Perro	*Canis familiaris*	39
Gato	*Felis domesticus*	19	Pollo	*Gallus domesticus*	39
Ratón doméstico	*Mus musculus*	20	Carpa	*Cyprinus carpio*	52
Mono rhesus	*Macaca mulatta*	21			

CUADRO 3-2. Cromosomas humanos

Grupo	Número	Representación esquemática	Longitud relativa*	Índice centromérico†
Cromosomas grandes				
A	1		8.4	48 (M)
	2		8.0	39
	3		6.8	47 (M)
B	4		6.3	29
	5		6.1	29
Cromosomas medios				
C	6		5.9	39
	7		5.4	39
	8		4.9	34
	9		4.8	35
	10		4.6	34
	11		4.6	40
	12		4.7	30
D	13		3.7	17 (A)
	14		3.6	19 (A)
	15		3.5	20 (A)
Cromosomas pequeños				
E	16		3.4	41
	17		3.3	34
	18		2.9	31
F	19		2.7	47 (M)
	20		2.6	45 (M)
G	21		1.9	31
	22		2.0	30
Cromosomas sexuales				
	X		5.1 (grupo C)	40
	Y		2.2 (grupo G)	27 (A)

* Porcentaje respecto a la longitud total conjunta de una dotación haploide de 22 autosomas.

† Porcentaje que ocupa el brazo corto respecto a la longitud total del cromosoma. Los cuatro cromosomas más metacéntricos están señalados con una (M); los cua
más acrocéntricos, con una (A).

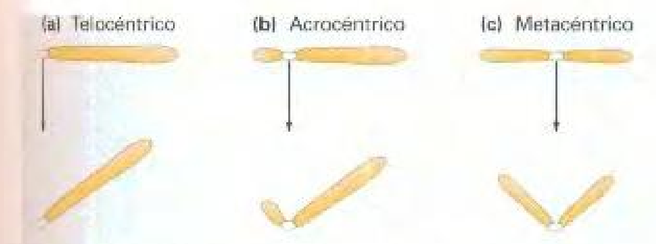


Figura 3-30. Clasificación de los cromosomas según la posición del centrómero. Un cromosoma telocéntrico tiene su centrómero en el extremo; cuando el cromosoma se desplaza hacia un polo de la célula, durante la anafase de la división celular, tiene el aspecto de un pequeño bastón. Un cromosoma acrocéntrico tiene su centrómero entre el extremo y el centro del cromosoma; durante el desplazamiento de la anafase, el cromosoma tiene forma de J. Un cromosoma metacéntrico tiene su centrómero en el centro y durante la anafase tiene forma de V.

sirve para clasificarlos en distintos grupos. De modo que pueden identificarse anomalías en, por indicar un ejemplo, «uno de los cromosomas del grupo de tamaño A».

Centrómeros

El centrómero es la región del cromosoma a la que se unen las fibras del huso. La región centromérica se observa normalmente como un estrechamiento y su posición define la relación entre las longitudes de los dos brazos cromosómicos. Esta relación es una característica muy útil para la identificación de los cromosomas (Cuadro 3-2). Según las posiciones de sus centrómeros, los cromosomas se clasifican en **telocéntricos** (con el centrómero en un extremo), **acrocéntricos** (cerca del extremo) o **metacéntricos** (en el centro).

La posición del centrómero no sólo determina la relación de longitud entre los brazos, sino también la forma de los cromosomas cuando migran a los polos opuestos en la anafase. En este período, los cromosomas pueden tener formas distintas, desde un bastoncillo hasta forma de J o de V (Fig. 3-30). En ciertos organismos, como en los lepidópteros, los centrómeros son «difusos», debido a que las fibras del huso se unen a lo largo de todo el cromosoma.

Posición de los organizadores nucleolares

Los **nucléolos** son estructuras esféricas que contienen RNA ribosómico, un componente importante de los ribosomas. Los distintos organismos difieren con respecto a los nucléolos, que varían en número desde sólo uno hasta muchos por dotación cromosómica. Las células diploides de muchas especies sólo tienen un par de nucléolos. Éstos están asociados a estrechamientos de los cromosomas denominados **organizadores nucleolares** (Fig. 3-31), que se encuentran en posiciones muy específicas dentro de la dotación cromosómica. Los organizadores nucleolares contienen los genes que determinan los RNA ribosómicos. Las posiciones de los nucléolos, al igual que las posiciones de los centrómeros, son marcadores muy útiles para el análisis citogenético.



Figura 3-31. El nucléolo y el organizador nucleolar del hongo haploide *Neurospora*. (Namboori Raju.)

Distribución de los cromómeros

Los **cromómeros** son engrosamientos localizados a lo largo del cromosoma, parecidos a las cuentas de collar, que se observan durante la profase de la mitosis y la meiosis. Las posiciones de los cromómeros tienden a ser fijas en los cromosomas homólogos. Aunque los cromómeros son muy buenos marcadores, su naturaleza molecular es desconocida.

Patrones de heterocromatina

Cuando los cromosomas se tratan con compuestos químicos que reaccionan con el DNA, como el reactivo de Feulgen, se ponen de manifiesto regiones de distinta intensidad de tinción. Las regiones que se tiñen muy intensamente se conocen como **heterocromatina** y las regiones que se tiñen menos se llaman **eucromatina**. Esta distinción refleja el grado de compactación o enrollamiento del DNA en el cromosoma. La heterocromatina puede ser *constitutiva* o *facultativa*. La heterocromatina constitutiva es una característica permanente de un sitio específico del cromosoma y, en este sentido, es una propiedad hereditaria. La Figura 5-15 muestra algunos ejemplos significativos de heterocromatina constitutiva en el tomate. Como su nombre indica, la heterocromatina facultativa aparece a veces, que no siempre, en una posición cromosómica determinada. Los patrones de heterocromatina y eucromatina de los cromosomas constituyen buenos marcadores citogenéticos.

Patrón de bandas

Ciertos métodos especiales de tinción cromosómica han puesto de manifiesto la existencia de series intrincadas de bandas (rayas transversales) en una amplia gama de organismos. Las posiciones y tamaños de las bandas son muy específicas de cada cromosoma. Uno de los patrones de bandas básicos es el producido por el reactivo Giemsa, un colorante que tiñe el DNA tras la digestión proteolítica suave de los cromosomas. Dicho reactivo genera un patrón de regiones teñidas débilmente (bandas G claras) y

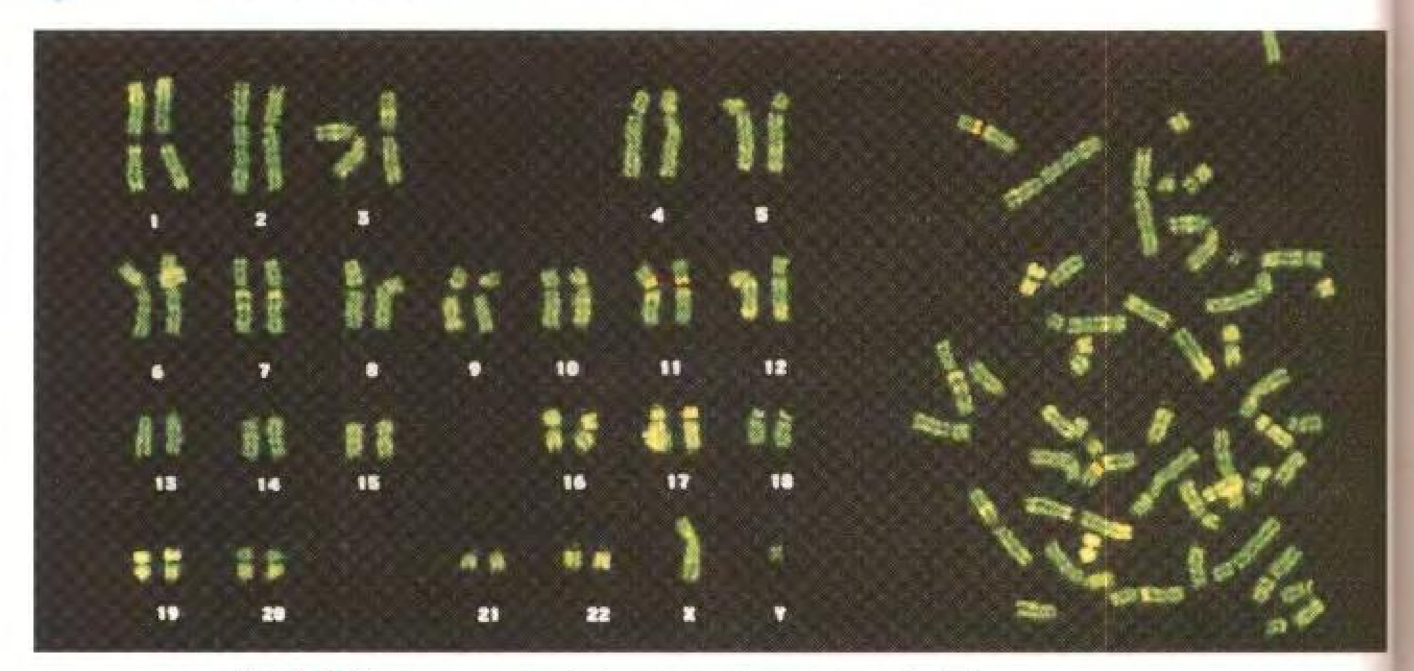


Figura 3-32. Cromosomas de un hombre teñidos con Giemsa para mostrar las bandas.

regiones teñidas intensamente (bandas G oscuras). La Figura 3-32 muestra un ejemplo de los patrones de bandas G en los cromosomas humanos. Estos patrones de bandas son constantes dentro de cada especie. En la dotación completa de 23 cromosomas humanos, existen aproximadamente 850 bandas G oscuras visibles en la metafase mitótica. Estas bandas resultaron muy útiles para subdividir las distintas regiones de los cromosomas, de modo que a cada una de ellas se le ha asignado un número específico.

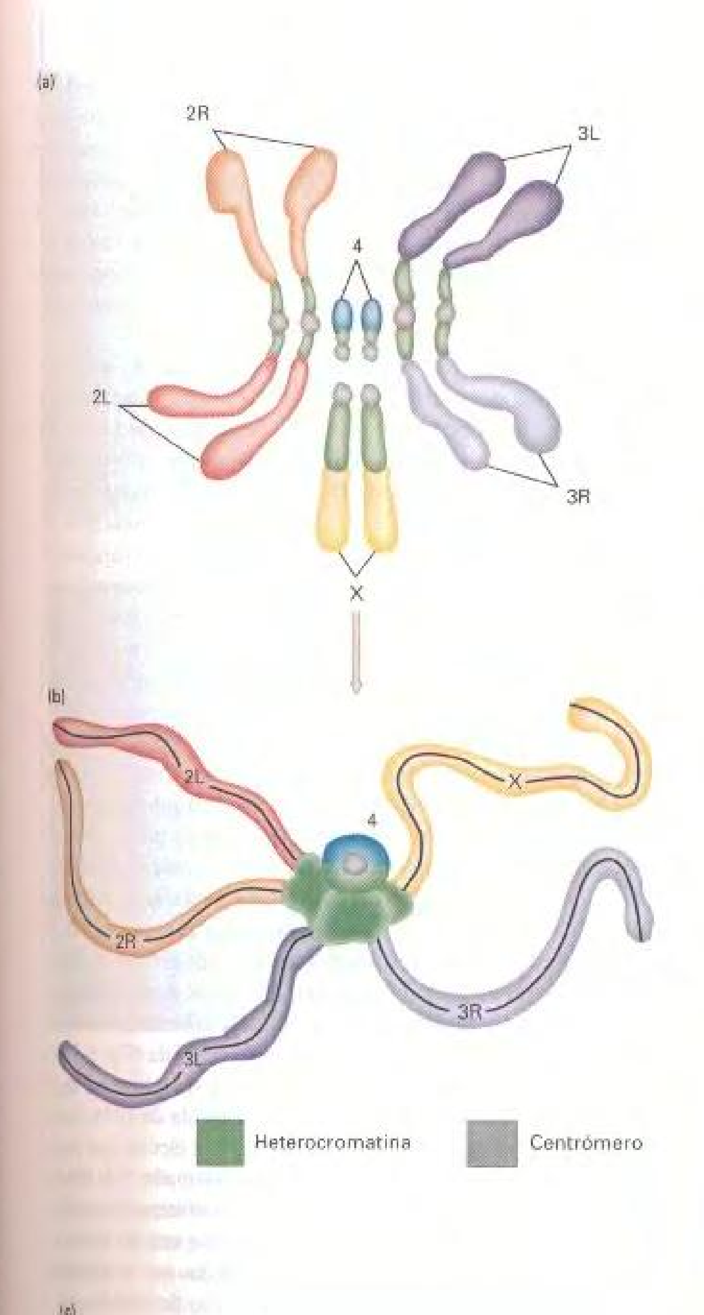
Se pensaba que la diferencia entre las bandas claras y oscuras estaba relacionada con las diferentes proporciones de bases: las bandas G claras serían relativamente ricas en pares GC y las bandas G oscuras en pares AT. Sin embargo, en la actualidad se piensa que la diferencia en la proporción de bases es demasiado pequeña para dar cuenta de los distintos patrones de bandas. Parece que el factor crucial es la densidad de empaquetamiento de la cromatina: las regiones G oscuras se encuentran más densamente empaquetadas, con enrollamientos más estrechos, que dan lugar a una mayor densidad de DNA para la incorporación del colorante.

Además, se han establecido algunas otras conclusiones. Por ejemplo, estudios con desoxinucleótidos marcados han demostrado que las bandas G claras corresponden a zonas de replicación temprana. Más aún, si se emplea RNA mensajero polisómico (poli-*ribo*sómico, que corresponde a los genes que se están transcribiendo activamente) para marcar los cromosomas *in situ*, la mayor parte de la marca se incorpora en las regiones G claras, lo cual sugiere que estas regiones contienen la mayoría de los genes activos. De este análisis, se concluyó que la densidad de genes activos es mayor en las bandas G claras.

Nuestra visión de las bandas cromosómicas se basa sobre todo en cómo se tiñen los cromosomas durante la metafase mitótica. Sin embargo, los dominios revelados por las bandas metafásicas deben estar presentes también durante la interfase, en las mismas posiciones relativas, formen bandas o no.

Un sistema especial de bandas que los citogenetistas han utilizado durante muchos años es característico de los denominados **cromosomas politénicos** de ciertos órganos de insectos dípteros. Los cromosomas politénicos se desarrollan de la siguiente manera. En tejidos secretores, como los tubos de Malpighi, recto, intestino, almohadillas de las patas y glándulas salivales de dípteros, los cromosomas replican muchas veces su DNA sin que éste se separe en diferentes cromátidas. A medida que el cromosoma aumenta su número de réplicas, se alarga y se engrosa. Este manojo de réplicas da lugar al cromosoma politénico. Tomemos como ejemplo a *Drosophila*. El número $2n$ de este insecto es ocho, pero las células de los órganos especiales sólo contienen cuatro cromosomas politénicos. Hay cuatro cromosomas, y no ocho, porque durante este proceso especial de replicación, los miembros de cada par homólogo se unen de forma inesperada. Además, los cuatro cromosomas politénicos quedan unidos a una estructura denominada **cromocentro**, que es una fusión de las regiones heterocromatínicas localizadas alrededor de los centrómeros de los cuatro pares de cromosomas. El cromocentro de los cromosomas de las glándulas salivales de *Drosophila* se muestra en la Figura 3-33, donde las letras L y R se refieren a los brazos derecho e izquierdo, asignados de forma arbitraria.

A lo largo de un cromosoma politénico se observan **bandas** transversales. Estas bandas son mucho más numerosas que las bandas Q, G o R, observándose por centenares en cada cromosoma. Las bandas varían en anchura y morfología, de modo que el patrón con el que aparecen en cada cromosoma es único y característico. Además, hay regiones que a veces aparecen hinchadas (**puffs** o **engrosamientos cromosómicos**) y a veces muy distendidas (**anillos de Balbiani**). Estas regiones corresponden a zonas de síntesis de RNA. Estudios moleculares recientes han demostrado que en cualquier región cromosómica de *Drosophila* hay más genes que bandas politénicas y, por tanto, las bandas



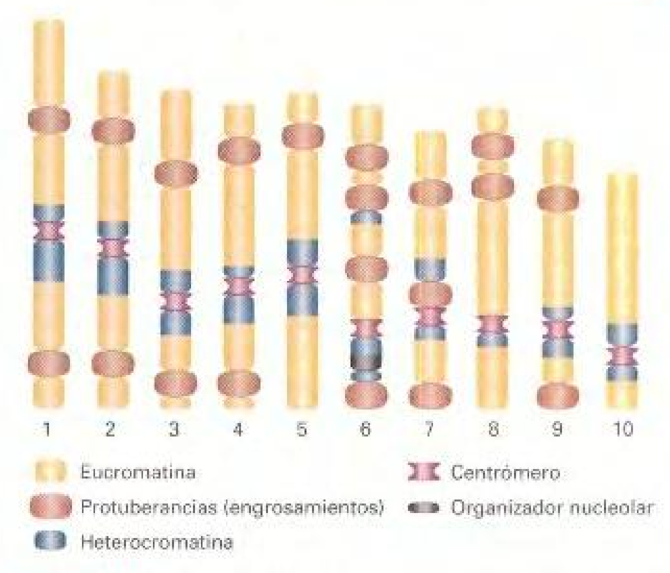


Figura 3-34. Los marcadores que caracterizan a los cromosomas del maíz.

no se corresponden con genes. De modo similar, no está claro el significado del patrón de bandas de los cromosomas de animales vertebrados. No obstante, como se ha mencionado anteriormente, se piensa que las bandas cromosómicas están relacionadas con diferencias en el grado de condensación del DNA y que la mayoría de los genes activos residen en las regiones de bandas claras.

Mediante la utilización conjunta de los marcadores cromosómicos disponibles, los citogenetistas pueden distinguir los cromosomas individuales de muchas especies. Como ejemplo, la Figura 3-34 muestra un mapa de los marcadores cromosómicos del genoma de maíz. Observe cómo éstos permiten distinguir con el microscopio cada uno de los 10 cromosomas.

COROLARIO

Propiedades como la longitud, la relación de tamaño entre los brazos, la heterocromatina, el número y la posición de los engrosamientos, el número y la localización de los organizadores nucleolares y la distribución de bandas permiten identificar a cada uno de los cromosomas de la dotación que caracteriza a una especie.

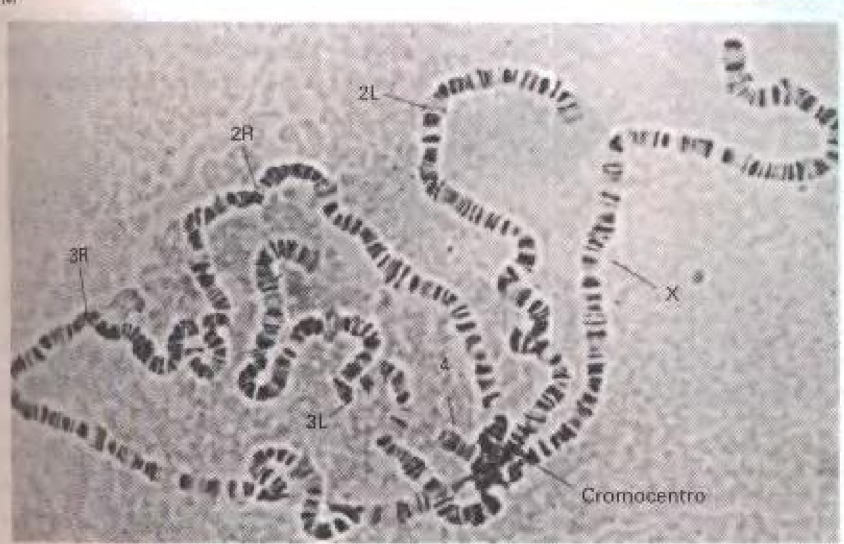


Figura 3-33. Los cromosomas politénicos forman un cromocentro en una glándula salival de *Drosophila*. (a) Cromosomas en metafase mitótica, con los brazos representados por distintos sombreados. (b) La heterocromatina se condensa para formar el cromocentro. (c) Fotografía de cromosomas politénicos. (Tom Kaufman.)

Estructura tridimensional de los cromosomas

¿Cuánto DNA hay en una dotación cromosómica? El único cromosoma de *Escherichia coli* contiene alrededor de 1.3 mm de DNA. En claro contraste, una célula humana contiene unos 2 m de DNA (1 m por dotación cromosómica). El cuerpo humano está constituido por unas 10^{13} células y, por tanto, contiene en total unos 2×10^{13} m de DNA. Podemos hacernos una idea de la extrema longitud de este DNA si lo comparamos con la distancia de la Tierra al Sol, que es de 1.5×10^{11} metros. Ello significa que el DNA de nuestro cuerpo podría extenderse hasta el Sol y volver casi 50 veces. Este hecho peculiar nos permite asegurar que el DNA de los eucariotas debe estar empaquetado de forma muy eficaz. En realidad, el empaquetamiento ocurre en el núcleo, donde los dos metros de DNA de cualquier célula humana se condensan en 46 cromosomas, todos ellos dentro de un núcleo que sólo mide 0.006 mm de diámetro. En este apartado, vamos a describir lo que sabemos sobre la estructura y la función de los genes eucarióticos en el «mundo real» del núcleo. Así que, en lugar de imaginarnos las maquinarias de replicación y transcripción desplazándose a lo largo de las líneas rectas que hemos empleado para representar los genes en los Capítulos 1 y 2, ahora tenemos que entender el hecho de que todos esos procesos tienen lugar en lo que se parecería mucho al interior de un ovillo de lana densamente enrollado.

Una molécula de DNA por cromosoma

Si se rompen células eucarióticas y se examina el contenido de sus núcleos al microscopio electrónico, los cromosomas aparecen como masas de fibras con forma de espagueti, de unos 30 nm de diámetro. Algunos ejemplos se muestran en la Figura 3-35. En los años sesenta, Ernest DuPraw estudió cuidadosamente tales cromosomas, comprobando que no había extremos libres que salieran de la masa fibrilar. Esto sugiere que cada cromosoma es una sola fibra, larga y fina, plegada de alguna manera sobre sí misma. Si la fibra se corresponde de algún modo con una molécula de DNA, llegamos a la conclusión de que cada cromosoma está formado por una única molécula de DNA densamente empaquetada.

En 1973, Ruth Kavenoff y Bruno Zimm realizaron ciertos experimentos que demostraban que, muy probablemente, eso era lo que ocurría. Analizaron DNA de *Drosophila* mediante una técnica de enrollamiento viscoelástico que permitía determinar el tamaño de las moléculas de DNA en solución, midiendo sus propiedades de enrollamiento elástico. En palabras sencillas, el procedimiento equivale a estirar una goma enrollada para medir luego cuánto tiempo tarda en volver al estado completamente enrollado. El DNA se estira revolviéndolo en solución con una pequeña paleta, y se deja enrollar luego hasta su estado relajado. Se sabe que el tiempo que tarda en volver a enrollarse es proporcional al tamaño de las moléculas más largas presentes en la solución. En su estudio en *Drosophila melanogaster*, que tiene cuatro pares de cromosomas, Kavenoff y Zimm obtuvieron el valor de 41×10^9 dalton para la molécula más larga del genoma silvestre. A continuación, analizaron dos reorganizaciones cromosómicas de distinto tamaño y demostraron que la viscoelasticidad era proporcional al tamaño. Parecía como si, ciertamente, el cromosoma fuera una molécula de DNA continua que va de un extremo al otro a través del centrómero. Kavenoff y Zimm también fueron capaces de componer varias micrografías electrónicas de moléculas de DNA de alrededor de 1.5 cm de largo, presumiblemente correspondientes cada una a un cromosoma de *Drosophila* (Fig. 3-36).

Hoy día, los genetistas pueden demostrar directamente que ciertos cromosomas contienen una sola molécula de DNA, mediante la electroforesis de campo pulsante, una técnica que permite separar moléculas largas de DNA por su tamaño. Si el DNA de un organismo cuyos cromosomas son relativamente pequeños, caso de *Neurospora*, se hace correr en este aparato durante períodos de tiempo largos, el número de bandas que se separan en el gel es igual al de cromosomas (en el caso de *Neurospora*,

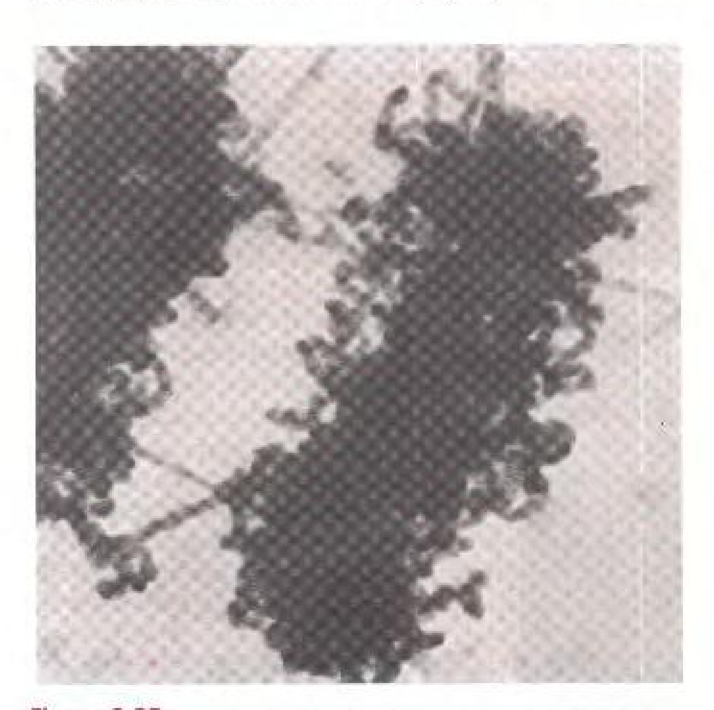


Figura 3-35. Micrografía electrónica de cromosomas en metafase de una abeja. Cada cromosoma parece estar compuesto por una fibra continua de 30 nm de ancho. (De E. J. DuPraw, *Cell and Molecular Biology*, Copyright © 1968. Academic Press.)



Figura 3-36. Composición de varias micrografías electrónicas de una molécula de DNA de *Drosophila*. La longitud total es de 1.5 cm y se cree que corresponde a un cromosoma completo. (De R. Kavenoff, L. C. Klotz y B. H. Zimm, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 38, 1974, 4.)

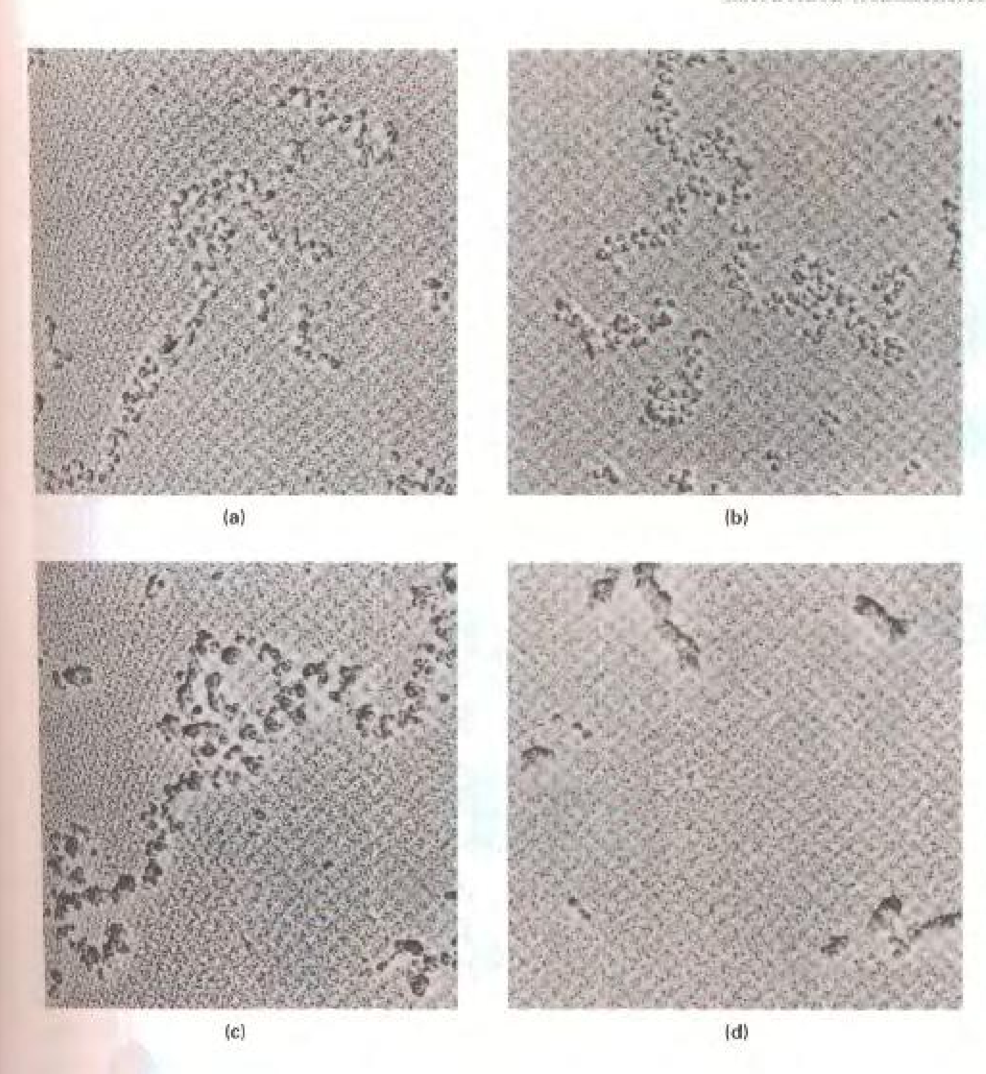


Figura 3-37. Micrografías electrónicas realizadas por Fritz Thomas y Theo Koller donde se demuestra la condensación de la cromatina con concentraciones crecientes de sales. Con concentraciones muy bajas de sal, como en (a), la cromatina forma una fibra relajada de unos 10 nm de espesor; los nucleosomas se encuentran unidos por tramos cortos de DNA. A una fuerza iónica cercana a la de las condiciones fisiológicas, como en (d), la cromatina forma una fibra más gruesa, de unos 30 nm de espesor. El origen de este solenoide puede deducirse mediante el examen de la cromatina con fuerzas iónicas crecientes intermedias, como en (b) y (c). Esta estructura se produce por un enrollamiento compacto del filamento nucleosómico. La cromatina se observa aquí aumentada 80 000 veces.

siete). Si cada cromosoma contuviera más de una molécula de DNA, se esperaría que el número de bandas fuera mayor que el número de cromosomas. Esta técnica de separación no puede emplearse con organismos cuyos cromosomas son muy grandes (caso del hombre y *Drosophila*) porque las moléculas de DNA resultan demasiado largas para moverse a través del gel, pero, así y todo, todas las pruebas apuntan al principio general de que un cromosoma contiene una única molécula de DNA.

COROLARIO

Cada cromosoma eucariótico contiene una sola molécula de DNA, larga y plegada.

Función de las histonas en el empaquetamiento del DNA

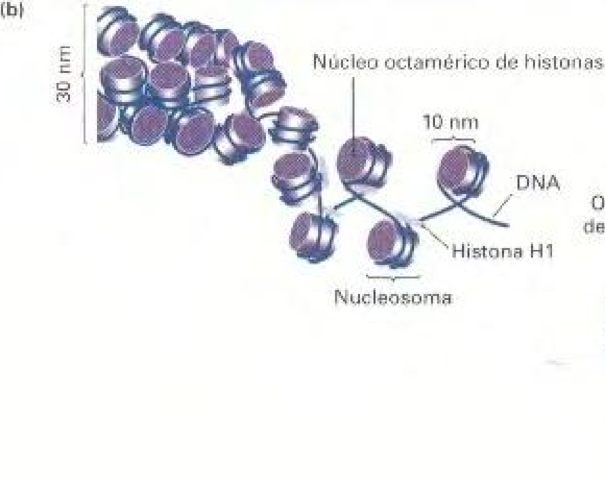
Hemos visto que, siendo la longitud de una molécula de DNA cromosómico mayor que la longitud del propio cromosoma, debe existir un sistema eficaz de empaquetamiento. ¿Cuáles son los mecanismos exactos que permiten empaquetar el DNA en cromosomas? ¿Cómo se convierte la larguísima cinta de DNA en el bastoncillo relativamente grueso y denso que es el cromosoma? La mezcla completa de materiales de los que se componen los cromosomas recibe el nombre general de **cromatina**. Se trata de DNA y proteínas. Si se extrae la cromatina y se somete a diferentes concentraciones de sal, se observan al microscopio electrónico diferentes grados de compactación o condensación (Fig. 3-37). A baja concentración salina, se observa una estructura de unos 10 nm de diámetro que se asemeja a un collar de perlas. El hilo que une las cuentas del collar puede digerirse con la enzima DNasa, de lo que podemos inferir que el hilo está formado por DNA. Las cuentas del collar se denominan **nucleosomas**, que consisten en complejos de DNA y unas proteínas cromosómicas especiales que reciben el nombre de **histonas**. La estructura de las histonas está notablemente conservada en el amplio abanico de los organismos eucarióticos y los nucleosomas siempre están formados por un octámero compuesto por dos unidades de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. El DNA da dos vueltas alrededor de cada octámero, como se aprecia en la Figura 3-38*a*. Cuando se aumenta la concentración de sal, el collar de nucleosomas asume gradualmente una forma enrollada denominada **solenoide** (Fig. 3-38*b*). El solenoide que aparece *in vitro* tiene un diámetro de 30 nm y corresponde, proba-

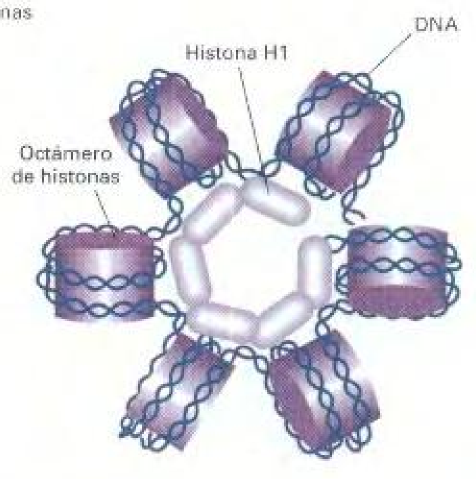
(a)



Figura 3-38. (a) Modelo de un nucleosoma que muestra al DNA enrollado dos veces alrededor de un octámero de histonas. (b) Dos vistas de un modelo del solenoide de 30 nm con los octámeros de histonas representados como discos de color morado. (*Izquierda*) Vista lateral parcialmente desenrollada. (*Derecha*) Vista desde un extremo. Se muestra a la histona adicional H1 rodeando a la parte central de la espiral, donde probablemente actúa como estabilizador. Al ir aumentando la concentración de sales, los nucleosomas se cierran para formar el solenoide, con seis nucleosomas por vuelta. (Parte a, Alan Wolffe y Van Moudrianakis. Parte b, de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed, Copyright © 1995, Scientific American Books.)

(b)





blemente, a las estructuras en forma de espagueti que aparecen *in vivo* y que se mostraron en la Figura 3-35. El solenoide mantiene su forma mediante otra histona, H1, que se dispone en el centro a lo largo del eje de la estructura, como se muestra en la Figura 3-38*b*.

Vemos, pues, que para conseguir este primer nivel de empaquetamiento, el DNA se enrolla alrededor de las histonas, que actúan, de alguna forma, como bobinas de hilo. Un nuevo enrollamiento genera la conformación en solenoide. Sin embargo, se requiere un grado adicional de compactación para convertir a los solenoides en la estructura tridimensional que llamamos *cromosoma*.

Enrollamientos de orden superior

Muchos estudios citogenéticos indican claramente que los cromosomas están visiblemente enrollados; la Figura 3-39 muestra

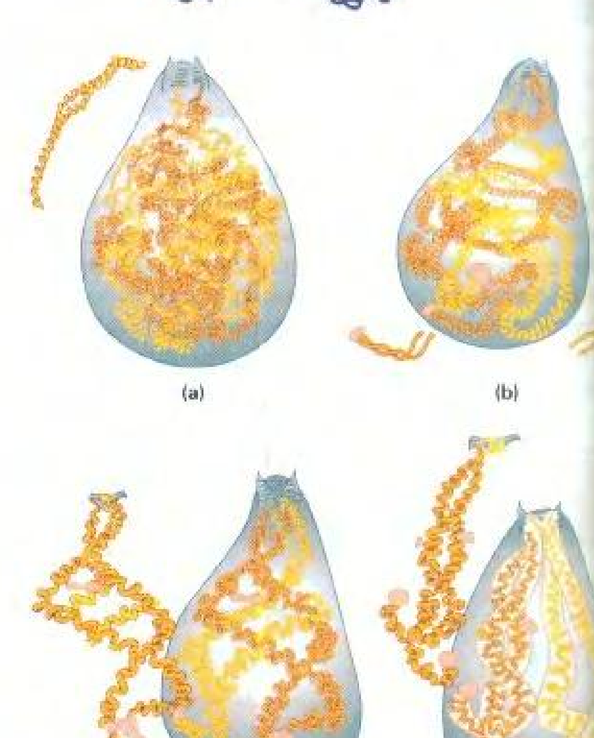


Figura 3-39. Dibujo que representa los cromosomas de un protozoo en la profase meiótica y que muestra los distintos grados de enrollamiento y superenrollamiento visibles con el microscopio óptico. Se muestran dos cromosomas grandes, uno en color amarillo y otro en naranja; la progresión es de (a) a (d). (a) Se observa enrollamiento, aunque son aparentes las zonas duplicadas. (b) La duplicación está bastante avanzada. (c) Comienza el superenrollamiento. (d) El superenrollamiento está bastante avanzado. (De L. R. Cleveland, «The Whole Life Cycle of Chromosomes and Their Coiling Systems», *Transactions of the American Philosophical Society*, 39, 1949, 1.)



Figura 3-40. Micrografía electrónica de un cromosoma en metafase de una célula humana cultivada. Observe el armazón interno, a partir del cual las cadenas de DNA se extienden hacia fuera. No se aprecian extremos visibles en la parte más externa. Incluso a mayor aumento, se observa claramente que cada lazo comienza y termina cerca de la misma región del esqueleto. (De W. R. Baumbach y K. W. Adolph, *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1977.)

un buen ejemplo del núcleo de un protozoo. Mientras que el diámetro de los solenoides es de 30 nm, el diámetro de estos elementos enrollados es el mismo que el del cromosoma durante la división celular, frecuentemente unos 700 nm. ¿Qué produce estos superenrollamientos? Una pista interesante se obtiene al observar cromosomas a los que hemos desprovisto de histonas por métodos químicos. Tras este tratamiento, los cromosomas presentan un cuerpo central densamente teñido, formado por proteínas no histónicas y denominado **armazón interno**, como se ve en la Figura 3-40 y en la micrografía electrónica de la portada de este capítulo. Proyectándose lateralmente a partir del armazón, se observan los lazos de DNA. A mayor aumento, en las micrografías electrónicas queda claro que cada lazo de DNA comienza y termina en el armazón. El armazón interno está compuesto básicamente por la enzima topoisomerasa II, que es capaz de pasar una cadena de DNA a través de otra que ha sido previamente cortada. Evidentemente, el armazón interno organiza la compleja madeja de DNA durante la replicación, evitando los posibles problemas derivados del desenrollamiento de las cadenas de DNA en ese momento crucial. En cualquier caso, está bien establecido que existe un armazón en los cromosomas eucarióticos y que parece ser un elemento de organización fundamental de dichos cromosomas.

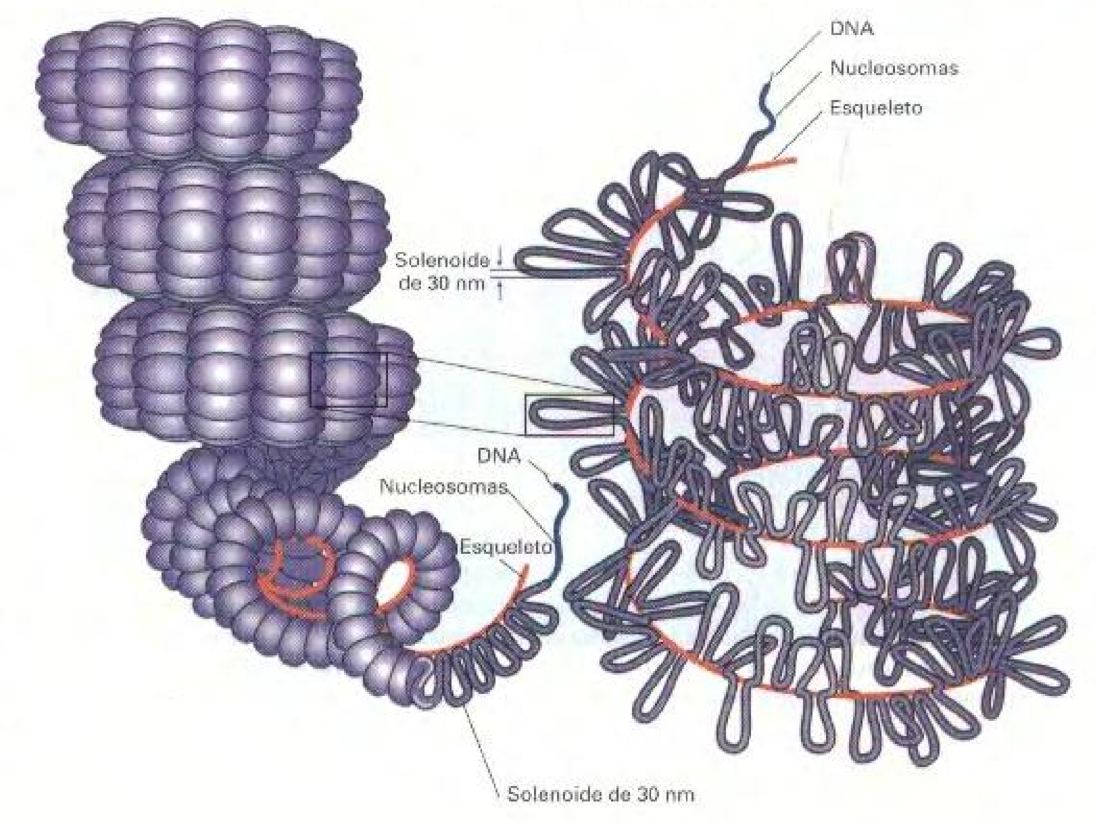


Figura 3-41. Modelo de la estructura del cromosoma. A la izquierda se muestra un enrollamiento compacto, que representaría la metafase: en este caso, los lazos están muy densamente empaquetados y sólo se observa su parte exterior. En los extremos libres, los solenoides se muestran desenrollados, para dar una idea de la escala relativa. A la derecha se muestra una estructura superenrollada más relajada, como se observa en la interfase.

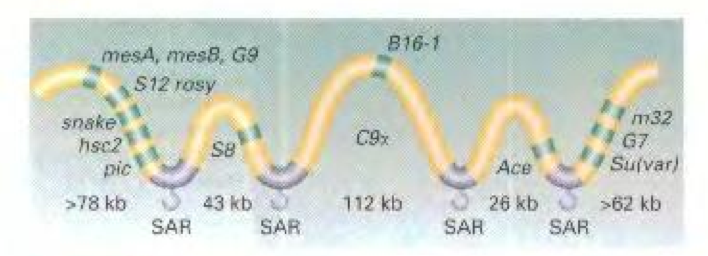


Figura 3-42. Algunos dominios de un lazo, cartografiados en *Drosophila*. Se muestran varios loci génicos y las regiones de unión al armazón interno (SAR).

Volvamos ahora a la cuestión de cómo se produce el superenrollamiento del cromosoma. Las mejores pruebas sugieren que los solenoides se organizan en lazos que emanan de la matriz central del armazón que, a su vez, tiene forma de espiral. Una idea general de esta estructura aparece en la Figura 3-41, que ofrece una representación de un cromosoma poco enrollado de una célula en interfase y de un cromosoma enrollado de forma más compacta durante la metafase. ¿Cómo se unen los lazos al esqueleto? Parece que hay regiones especializadas del DNA denominadas **regiones de unión al armazón** (SAR, del inglés *Scaffold Attachment Regions*). Pruebas de ello son las siguientes. Si se trata la cromatina sin histonas con enzimas de restricción, los lazos de DNA se liberan del esqueleto, pero ciertas regiones especiales permanecen unidas al mismo. Estas regiones son resistentes a la digestión con exonucleasas y se ha demostrado que hay proteínas unidas a ellas. En el caso de *Drosophila*, cuando se eliminan las proteínas mediante digestión con proteasas, se demuestra que las regiones de DNA que estaban unidas a dichas proteínas contienen secuencias conocidas por ser específicas para la unión de la topoisomerasa. Es probable, pues, que estas regiones sean las SAR que unen los lazos al armazón. Algunos lazos concretos de *Drosophila* que han sido cartografiados aparecen en la Figura 3-42. El tamaño de estos lazos varía entre 4.5 y 112 Kb. Las SAR están sólo en zonas del DNA que no se transcriben.

COROLARIO

En los niveles progresivos de empaquetamiento cromosómico,
1. **El DNA se enrolla sobre los nucleosomas, que actúan como bobinas de hilo.**
2. **La ristra de nucleosomas se enrolla formando un solenoide.**
3. **El solenoide forma lazos anclados a un esqueleto central.**
4. **El esqueleto unido a los lazos se dispone en un solenoide gigante.**

Naturaleza de la heterocromatina y la eucromatina

¿Cuál es la base molecular de las regiones teñidas intensamente llamadas *heterocromatina* y de las teñidas con menos intensidad llamadas *eucromatina* (Fig. 3-43)? Experimentos de cartografía cromosómica demuestran que la mayoría de los genes activos se detectan mediante mutaciones situadas en la eucromatina. La eucromatina se tiñe con menos intensidad porque está empaquetada de forma más relajada, y la idea general es que éste es el estado más compatible con la transcripción y la actividad génica. En la

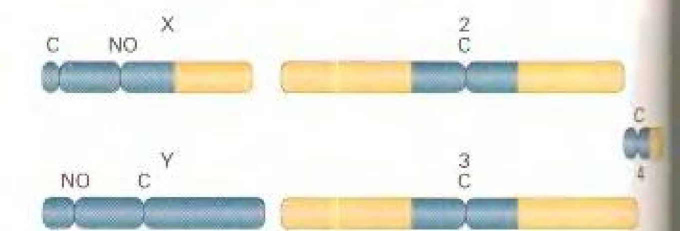


Figura 3-43. Posiciones que ocupa la heterocromatina en *Drosophila*. C representa los centrómeros y NO los organizadores nucleolares. El cromosoma 2 contiene una constricción cromosómica secundaria. La heterocromatina se representa en tono más oscuro (en azul). (De A. Hilliker y C. B. Sharp, *Chromosome Structure and Function*, J. P. Gustafson y R. Appels, eds. Plenum, 1988, pág. 91-95.)

mayoría de los organismos, la heterocromatina aparece flanqueando los centrómeros, pero algunos cromosomas completos, como el cromosoma Y de *Drosophila*, son heterocromáticos.

Los estudios más completos sobre genética de la heterocromatina se han realizado en *Drosophila*. Algunos genes esenciales de este organismo están situados en la heterocromatina, aunque se desconoce la función de la mayoría de dichos genes. La fracción de heterocromatina de *Drosophila* en la cual se cartografían genes es sólo 1/100 de la fracción de eucromatina de *Drosophila* que se cartografía como genes. Por tanto, existen largos tramos de DNA entre los genes funcionales. Observe que existe una clara diferencia en la actividad génica de las dos clases de cromatina.

Si pensamos en la arquitectura de los cromosomas, una pregunta de interés es en qué difiere la heterocromatina de la eucromatina y, más importante, cómo se mantiene esta diferencia. En primer lugar, como hemos visto, la diferencia es el grado de condensación. No se sabe si esta diferencia es similar a la que existe entre cromosomas interfásicos y metafásicos (en otras palabras, una diferencia en la intensidad del enrollamiento, como muestra la Fig. 3-41) o si existen otras diferencias estructurales. La cuestión de cómo se mantiene esta diferencia entre eucromatina y heterocromatina también es difícil de contestar. De hecho, la respuesta no se conoce actualmente, pero está sujeta a una intensa investigación.

COROLARIO

La eucromatina contiene la mayoría de los genes activos. La heterocromatina está más condensada y se tiñe más intensamente.

Organización de las secuencias

¿Cómo están dispuestos los genes sobre los cromosomas? ¿Qué proporción del DNA cromosómico total corresponde a genes activos o potencialmente activos? ¿Cuál es la naturaleza del DNA que se encuentra entre los genes? En este apartado responderemos a algunas de estas preguntas. Como en la mayoría de los aspectos de la investigación, la situación resultó ser más compleja de lo esperado y reveló algunas sorpresas.

Algunos de los primeros resultados significativos vinieron de estudios en los que muestras de DNA de núcleos eucarióticos se calentaban, para separar las dos cadenas de la hélice doble, y se dejaban luego enfriar. Siempre que se hace esto, y debido a los

DNA eucariótico

Genes funcionales de copia única

DNA de secuencia repetida

DNA separador

Secuencias funcionales

Secuencias sin función conocida

Familias de genes que cifran productos (y pseudogenes relacionados)

Secuencias funcionales que no cifran producto

Repeticiones presentes en la heterocromatina centromérica

Repeticiones en tándem de número variable

Secuencias derivadas de transposiciones

Familias de genes dispersos

Familias de genes dispuestos en tándem

Transposones

Retrotransposones

Figura 3-44. Clasificación del DNA eucariótico.

movimientos aleatorios de las moléculas en disolución, las secuencias complementarias, como aquellas que inicialmente estaban unidas por puentes de hidrógeno en la hélice doble, acaban encontrándose con el tiempo unas con otras. Este proceso se denomina **reasociación**. Sin embargo, la reasociación del DNA en estos estudios era sorprendentemente más rápida de lo que se esperaría para el encuentro de las dos cadenas separadas del gen. Para explicar la cinética de reasociación había que postular la existencia de una clase de DNA que está presente en el genoma en múltiples copias. Este DNA ha recibido el nombre de **DNA repetido**. Los genes de copia única acaban por reasociarse, aunque se toman más tiempo para hacerlo. Ahora sabemos que hay varias clases de DNA repetido. Podemos clasificar el DNA eucariótico como se muestra en la Figura 3-44. El tipo de DNA al que hasta ahora hemos venido dedicando toda nuestra atención en este libro, los genes de copia única (Fig. 3-45), están embebidos en un entramado variado de DNA repetidos.



Figura 3-45. Cromosomas sometidos a hibridación *in situ* con una sonda fluorescente específica de un gen con una sola copia por dotación cromosómica (el gen de una proteína muscular en este caso). Sólo un locus muestra puntos fluorescentes, correspondientes a la sonda unida al gen de la proteína muscular. (De Peter Lichter *et al.*, *Science* 247, 1990, 64.)

Secuencias repetidas funcionales

Familias de genes dispersos. Varios tipos de proteínas están cifradas en familias de genes homólogos distribuidos por todo el genoma. Tales familias pueden estar compuestas por sólo unos pocos genes o por muchos, como ilustran algunos ejemplos: actinas, de 5 a 30 genes; queratinas, más de 20; cadena pesada de la miosina, de 5 a 10; tubulinas, de 3 a 15; proteínas de la envuelta del huevo en insectos, 50; globinas, hasta 5; región varia-

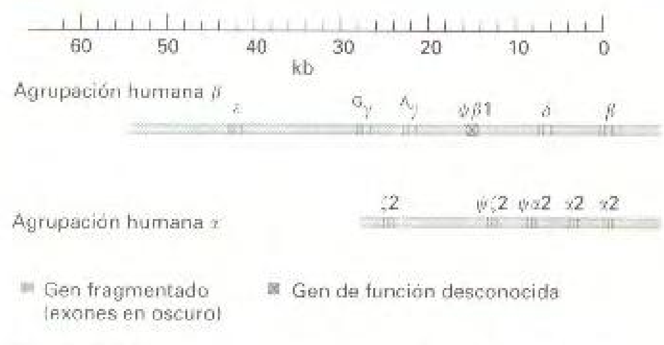


Figura 3-46. Las familias génicas humanas de las globinas tipo α y tipo β se encuentran organizadas en una sola agrupación que incluye genes funcionales y pseudogenes. Estos últimos están señalados aquí con el símbolo Ψ. (De B. Lewin, *Genes*, Wiley, 1983.)

ble de las inmunoglobulinas, 500; albúmina de huevo, 3; e histonas, de 100 a 1000. Dentro de una familia, las secuencias exactas de nucleótidos pueden variar y distintos genes homólogos pueden llegar a tener funciones ligeramente diferentes. Algunos genes de las familias han llegado a perder su función, dando lugar a **pseudogenes** no transcritos, como se ilustra en la Figura 3-46.

Familias de genes dispuestos en tándem. Las células necesitan grandes cantidades de los productos de ciertos genes, habiéndose llegado a formar familias de estos genes dispuestos en tándem. Un buen ejemplo es el organizador nucleolar (NO), observado nítidamente en preparaciones citológicas de núcleos antes de que se averiguara su función: se observaba con facilidad porque no se teñía con colorantes normales de la cromatina. Varios estudios genéticos y moleculares han permitido desvelar el papel del NO. Ahora sabemos que los NO de los cromosomas X e Y de *Drosophila* contienen, respectivamente, 250 y 150 copias en tándem de genes que cifran RNA ribosómico (rRNA). Un NO contiene unas 250 copias en la especie humana. Esta redundancia permite asegurar una producción alta de rRNA por célula.

COROLARIO

El organizador nucleolar, distinguible citológicamente, está formado por muchos genes dispuestos en tándem que cifran RNA ribosómico.

Otro ejemplo de disposición en tándem es el de los genes del RNA transferente (tRNA). En la especie humana existen unos 50 sitios cromosómicos que corresponden a distintos tipos de tRNA, y en cada uno de ellos encontramos de 10 a 100 copias de esos genes.

Finalmente, también los genes de las histonas están dispuestos en tándem en algunas especies (Fig. 3-47). Tanto en el caso de las histonas como en los otros casos de genes repetidos y dispuestos en tándem, el análisis de secuencia demuestra que las múltiples copias génicas son idénticas. Dado que uno esperaría que aparecieran algunas diferencias por mutación en puntos que no sean cruciales, parece que existe algún mecanismo que mantiene la identidad de secuencia entre los distintos miembros de la agrupación génica.

Secuencias funcionales que no cifran producto. Los telómeros, extremos de los cromosomas, están formados por ristras en tándem de secuencias sencillas de DNA que no cifran un RNA o una proteína pero, no obstante, cumplen una función definida. Por ejemplo, en el ciliado *Tetrahymena* la secuencia que se repite es TTGGGG, y en el hombre es TTAGGG. Las repeticiones teloméricas están ahí para resolver un problema funcional inherente a la replicación de moléculas lineales de DNA, del cual trataremos en el Capítulo 8.

Secuencias sin función conocida

No se conoce la función de algunos DNA repetidos. A esta categoría pertenecen secuencias de DNA de las que, en general, existen muchas más copias por genoma que de las secuencias funcionales descritas anteriormente. El tamaño conjunto de esta clase de DNA es sorprendente. Se calcula, por ejemplo, que alrededor del 20% del genoma humano consiste en secuencias repetidas no funcionales de uno u otro tipo. Hablaremos de tres de ellas.

DNA centromérico muy repetido. Después de centrifugar DNA genómico en un gradiente de densidad de cloruro de cesio aparecen a menudo bandas satélites, separadas de la banda principal de DNA. Este **DNA satélite** consta de múltiples repeticiones en tándem de secuencias cortas de DNA que llegan a alcanzar una longitud de centenares de kilobases. Si se preparan sondas de tales secuencias sencillas de DNA y se emplean en experimentos de marcado de cromosomas *in situ*, la mayoría del DNA satélite resulta estar localizado en las regiones heterocro-

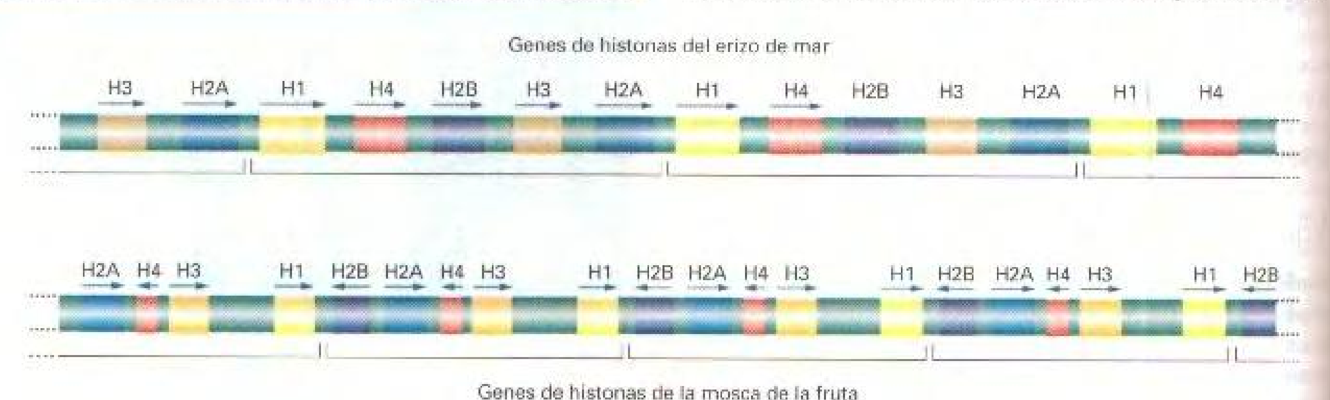


Figura 3-47. Repeticiones en tándem de los genes de las histonas del erizo de mar y la mosca de la fruta. Sólo se muestra una pequeña fracción de las repeticiones. Las flechas indican la dirección de la transcripción.

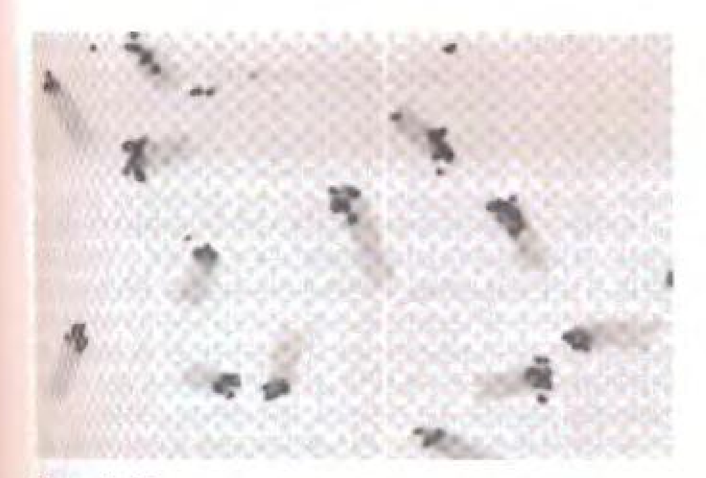


Figura 3-48. Localización por autorradiografía del DNA de ratón de secuencia sencilla en los centrómeros. Se añadió una sonda radiactiva de DNA de secuencia sencilla a los cromosomas, cuyo DNA había sido desnaturalizado. (Observe que todos los cromosomas de ratón tienen el centrómero en el extremo). (De M. L. Pardue y G. J. Gall, *Science* 168, 1970, 1356.)

matínicas que flanquean los centrómeros. Puede haber una o varias unidades básicas, pero normalmente su longitud no es mayor de 10 bases. En *Drosophila melanogaster*, por ejemplo, aparece la secuencia AATAACATAG repetida en tándem alrededor de todos los centrómeros. Igualmente, en el conejillo de Indias, la secuencia corta CCCTAA se repite en tándem a ambos lados de los centrómeros. En la Figura 3-48 se muestra un experimento de marcado *in situ* con DNA satélite de ratón.

Como las repeticiones centroméricas son una muestra no representativa del DNA genómico, su contenido en G + C puede ser significativamente distinto del resto del DNA. Ésta es la razón de que el DNA forme una banda separada en un gradiente de cloruro de cesio. El DNA centromérico repetido carece de función demostrada, tampoco sabemos qué relación tiene con la heterocromatina o con los genes presentes en la misma. Algunos organismos contienen una cantidad asombrosa de este DNA; el DNA satélite centromérico de canguro, por ejemplo, constituye hasta el 50% de su DNA total.

VNTR. Una clase especial de repeticiones en tándem muestra variación en el número de éstas entre diferentes loci y entre distintos individuos de la misma especie. Este tipo de repeticiones se denominan **VNTR** (del inglés, *Variable Number of Tandem Repeat*, **número variable de repeticiones en tándem**). Los loci VNTR humanos están formados por tramos de 1 a 5 Kb, constituidos por un número variable de repeticiones de una unidad de 15 a 100 nucleótidos de larga. Si se dispone de una sonda VNTR, y se trata el DNA genómico completo con una enzima de restricción que no cuenta con un punto de corte dentro de la ristra de VNTR, la técnica Southern permite poner de manifiesto un gran número de bandas de tamaños distintos que se unen a la sonda. Dada la variación de un individuo a otro en el número de repeticiones en tándem, la serie de fragmentos que aparecen en la autorradiografía del Southern resulta ser específica de cada individuo. En realidad, los patrones de distribución de bandas se conocen como **huella digital del DNA** y son de uso corriente en la medicina forense (Capítulo 14).

Otro tipo de DNA repetido disperso consiste en repeticiones de dinucleótidos. Este tipo de DNA repetido se denomina **DNA microsatélite**. Aunque los microsatélites no se incluyen normalmente en la clase VNTR, son en realidad regiones dispersas de DNA compuestas de un número variable de dinucleótidos repetidos en tándem. Dado que el número de repeticiones varía entre distintos individuos, este tipo de DNA ha sido muy útil para obtener una gran colección de marcadores moleculares para cartografiar grandes extensiones del genoma humano, como veremos en el Capítulo 14.

Secuencias derivadas de transposiciones. Gran parte del genoma eucariótico está compuesto por elementos repetidos que se han propagado en el genoma haciendo copias de sí mismos y que pueden trasladarse a otras posiciones. Dichos elementos reciben el nombre genérico de elementos genéticos transponibles y se describen en detalle en el Capítulo 20. Los que se trasladan en forma de DNA se denominan **transposones**. El material genético de muchos organismos contiene múltiples copias de estos elementos, o de versiones truncadas de los mismos, dispersos por todo el genoma.

Otro tipo general de secuencias transponibles corresponde a los **retrotransposones** (Fig. 3-49), secuencias que se han extendido por todo el genoma mediante la acción de la transcriptasa inversa, una enzima que fabrica una cadena de DNA a partir de una de RNA. Una clase de esta categoría consiste en secuencias repetidas cuya estructura está relacionada con la de los retrovirus. Se desplazan mediante la transcripción inversa de sus transcritos de RNA en DNA, que entonces se inserta por todo el genoma. Ejemplos de tales retrotransposones son los elementos *copia* de *Drosophila* (secuencias de 5 kb presentes en unas 50 copias por genoma) y los elementos *Ty* de levadura (secuencias de 6 kb, con unas 30 copias completas por genoma). Los **LINE** (del inglés, *Long INterspersed Elements*, **elementos intercalados largos**) de mamíferos son retroelementos no víricos de 1 a 5 Kb que están presentes en 20 000 a 40 000 copias por genoma humano.

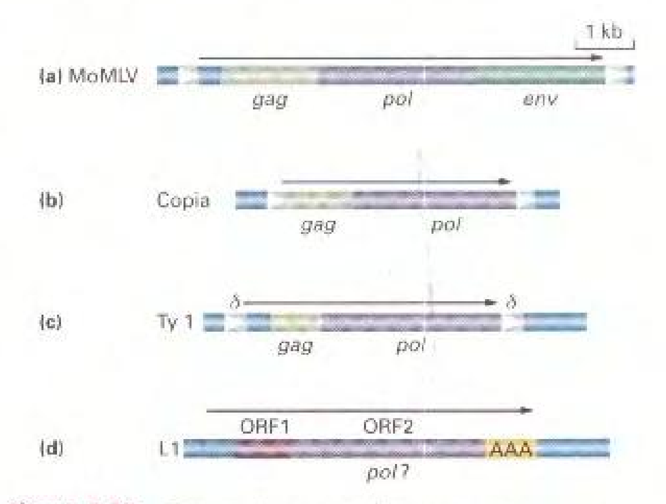


Figura 3-49. Estructura de cuatro retroelementos presentes en genomas eucarióticos: *gag*, *pol* y *env* son genes víricos; ORF1 y ORF2 son genes de función desconocida; AAA es la cola de poli(A) (presente en los mRNA); los triángulos indican repeticiones directas. (a) Un retrovirus, el virus de la leucemia murina Moloney. (b) Un retrotransposón de *Drosophila*, Copia. (c) Un retrotransposón de levadura, Ty1. (d) Una secuencia LINE humana, L1. (De J. R. S. Fincham, *Genetic Analysis: Principles, Scope and Objectives*, Blackwell, 1994.)

En la especie humana, la secuencia repetida Alu, llamada así porque contiene un punto de corte de la enzima de restricción *Alu*, es un ejemplo de un tipo de retrotransposones no relacionados con retrovirus. El genoma humano tiene cientos de miles de secuencias Alu completas o truncadas, dispersas entre los genes y en los intrones, llegando a constituir el 5 % del DNA total. La secuencia Alu completa tiene unos 200 nucleótidos y posee una semejanza notable con el RNA 7SL, un RNA que forma parte de un complejo implicado en la secreción de polipéptios recién sintetizados a través del retículo endoplásmico. Presumiblemente, las secuencias Alu se originaron como productos de la retrotranscripción de estas moléculas de RNA. Repeticiones cortas y dispersas como las secuencias Alu reciben el nombre genérico de **SINE** (del inglés, *Short INterspersed Elements*, **elementos intercalados cortos**).

Otros ejemplos de la clase de elementos moderadamente repetidos son los muchos *pseudogenes* que se encuentran dispersos por el genoma y que se crearon seguramente mediante el proceso de retrotranscripción, ya que carecen de los intrones que se encuentran en el gen funcional original.

DNA separador

La categoría final de DNA es el **DNA separador**. Se trata simplemente del DNA que queda una vez identificados todos los elementos reconocibles. No hay que decir que sabemos muy poco de su función. Posiblemente su único papel sea sólo ése, separar, pero aún no se han realizado estudios en los cuales se elimine este tipo de DNA y se observen las consecuencias.

COROLARIO

Los genes de copia única están embebidos en un complejo entramado de DNA repetido, en tándem o disperso, la mayoria del cual es de función desconocida.

La existencia de secuencias de DNA sin función conocida h[a] creado un dilema para los genetistas. Ideas previas sobre el p[o]der de la selección natural habrían predicho que el DNA no fu[n]cional desaparecería a causa de la selección. Si fuera tan sólo p[or] el gasto energético adicional que el organismo ha de invertir [en] la síntesis de este tipo de DNA, podríamos pensar que es un[a] sobrecarga genética. Sin embargo, esta idea no parece ser co[]rrecta. Quizá lo que parece DNA no funcional sí desempeña a[l]guna función, posiblemente como algún tipo de soporte genétic[o] que proporciona la masa adecuada para permitir el reparto efica[z] de DNA durante la división celular, o quizá que separa los el[e]mentos funcionales (los genes) para su regulación adecuada. A[l]ternativamente, los elementos repetidos que constituyen la ma[]yor parte del DNA no funcional pueden haber aparecido [de] modo que escapen a la detección de las fuerzas de la selecció[n] natural. Este tipo de DNA se ha denominado **DNA egoísta**, DNA que existe con el único propósito de existir y que nunca [se] expone a los rigores del fenotipo.

La Figura 3-50 es un diagrama simplificado sobre la organiza[]ción general de un cromosoma eucariótico hipotético, que res[u]me mucho de lo explicado anteriormente. En la Figura 3-51 [se] muestran algunos de los separadores que se conocen actualme[n]te, a partir de la secuenciación del DNA.

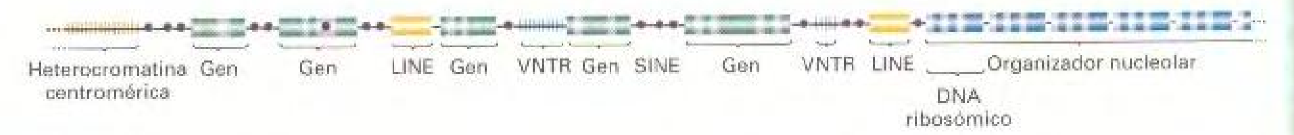


Figura 3-50. Representación general de la arquitectura de un cromosoma eucariótico. Esta pequeña región del cromosoma contiene cinco genes que determin[an] proteínas, un extremo con un organizador nucleolar y otro extremo de heterocromatina centromérica. Se muestran varios tipos de DNA de secuencia repetida. (Cada cromosoma contiene normalmente varios miles de genes.)

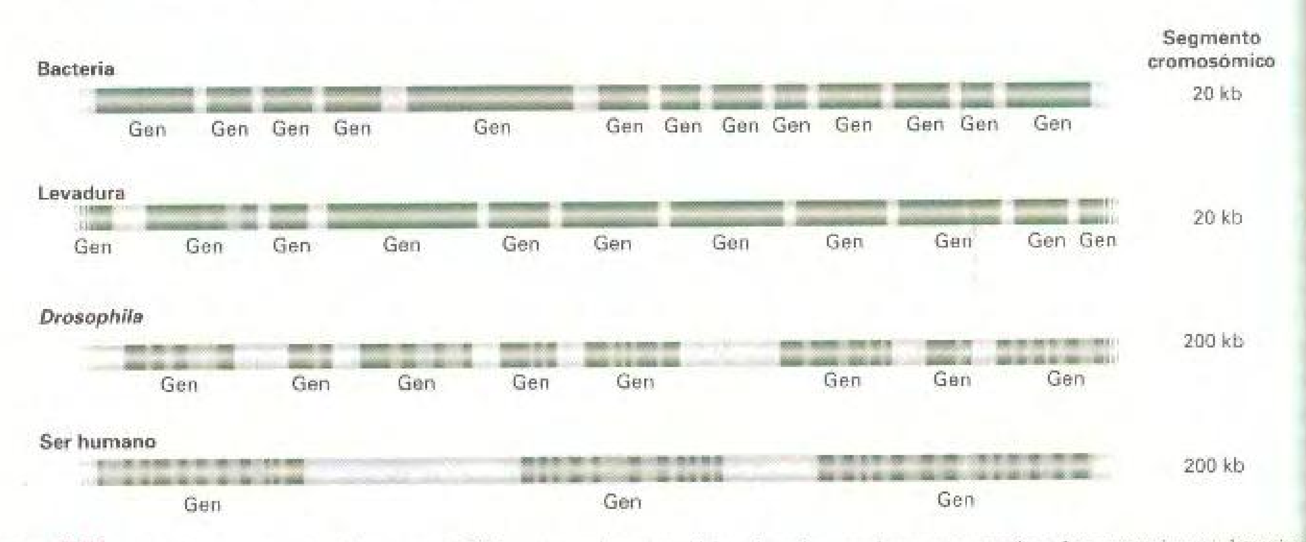


Figura 3-51. Tamaños aproximados de los genes (en kilobases) y regiones intergénicas de varios organismos representativos. Las secuencias que determinan proteína se muestran en verde oscuro, los intrones en verde claro. Hay que señalar que los segmentos de *Drosophila* y del ser humano mostrados son diez veces mayores que los de bacterias y levaduras.

RESUMEN

Tras el redescubrimiento de los principios mendelianos en 1900, los científicos se dispusieron a buscar qué estructuras dentro de las células se correspondían con las hipotéticas unidades de la herencia de Mendel, que hoy llamamos genes. Al darse cuenta de que el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis era paralelo al de los genes, Sutton y Boveri propusieron que los genes estaban situados en o sobre los cromosomas. Las observaciones de Morgan sobre la herencia ligada al sexo supuso un afianzamiento de la hipótesis. La prueba definitiva de que los genes están en los cromosomas se debe a la utilización que hizo Bridges del comportamiento de ciertas aberraciones cromosómicas para explicar anomalías en la herencia.

Hoy sabemos que los mecanismos cromosómicos son los que producen las proporciones mendelianas. La primera ley de Mendel (de la distribución igualitaria) es el resultado de la separación de una pareja de cromosomas homólogos en células opuestas, durante la primera división meiótica. La segunda ley de Mendel (de la segregación independiente) es el resultado del comportamiento independiente de distintas parejas de cromosomas homólogos.

Dado que las leyes mendelianas se basan en la meiosis, la herencia mendeliana se da en cualquier organismo con una fase meiótica en su ciclo de vida, incluyendo organismos diploides, haploides y organismos que alternan una generación haploide con otra diploide.

Los cromosomas se distinguen por un número de características topológicas como la posición del centrómero y del nucléolo, su tamaño y su patrón de bandas. El material del que están hechos los cromosomas es la cromatina, compuesta por DNA y proteínas. Cada cromosoma es una molécula de DNA que se enrolla alrededor de octámeros de histonas. En el intervalo entre dos divisiones celulares, los cromosomas se encuentran en un estado relativamente extendido, aunque todavía están asociados a las histonas. Durante la división celular, los cromosomas se condensan por el estrechamiento de su estado enrollado. Dicho estado les permite ser manejados fácilmente por el huso acromático.

El DNA eucariótico contiene parte de secuencias de copia única (los genes) y parte de secuencias repetidas. Las familias de genes funcionales, bien en tándem o dispersas, dan cuenta de parte del DNA de secuencia repetida. Algunos tipos de DNA muy repetido consisten en repeticiones de secuencias cortas sin función conocida. El número de repeticiones de un tipo determinado en una posición del cromosoma puede variar entre distintos individuos, dando lugar a una huella única de DNA.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

genes / cromosomas / meiosis / distribución igualitaria / segregación independiente / haploide / DNA / replicación / cromátida / histonas / DNA de secuencia repetida

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

Se cruzaron dos moscas de *Drosophila* de alas normales (transparentes y de forma alargada). En los descendientes aparecieron dos fenotipos nuevos: alas oscuras (de aspecto semiopaco) y alas recortadas (de extremos rectangulares). Los fenotipos de la descendencia fueron los siguientes:

Hembras	179 *transparentes, alargadas*
	58 *transparentes, recortadas*
Machos	92 *transparentes, alargadas*
	89 *oscuras, alargadas*
	28 *transparentes, recortadas*
	31 *oscuras, recortadas*

a. Dé una explicación genética a estos resultados, indicando el genotipo de los parentales y de todas las clases fenotípicas descendientes, según su modelo.

b. Diseñe un experimento que permita comprobar su modelo.

♦ Solución ♦

a. El primer paso que debemos dar es entresacar los aspectos más notables de los datos. El primer aspecto que nos sorprende es la aparición de dos fenotipos nuevos. Ya encontramos este fenómeno en el Capítulo 2, y lo explicamos por la presencia de alelos recesivos enmascarados por los correspondientes alelos dominantes. Así que empezaremos por suponer que una de las moscas parentales, o ambas, llevan alelos recesivos en dos genes diferentes. Esta inferencia se ve reforzada por la observación de que algunos descendientes manifiestan sólo uno de los nuevos fenotipos. Si los dos fenotipos nuevos aparecieran siempre juntos, podríamos suponer que un solo alelo recesivo es responsable de ambos.

Sin embargo, otro aspecto sorprendente de los datos, que no podemos explicar con los principios mendelianos del Capítulo 2, es la clara diferencia entre los dos sexos; aunque el número de machos es aproximadamente igual que el de hembras, los machos se distribuyen en cuatro clases fenotípicas, en tanto que las hembras se distribuyen sólo en dos. Ello sugiere inmediatamente algún tipo de herencia ligada al sexo. Al estudiar los datos, vemos que los fenotipos alas alargadas y alas recortadas segregan tanto en machos como en hembras, pero el fenotipo alas oscuras aparece solamente en los machos. Ello sugiere que el modo de herencia de la transparencia del ala difiere del modo de herencia de la forma del ala. En primer lugar, comprobamos que los fenotipos alas alargadas y alas recortadas aparecen en una proporción 3:1, tanto en machos como en hembras. Dicha proporción

podría explicarse si ambos parentales fueran heterocigóticos para un gen autosómico; podemos representarlos, por tanto, como *L/l*, donde *L* determina alas alargadas y *l*, alas recortadas.

Habiendo realizado este análisis parcial, comprobamos que es sólo el modo de herencia de la transparencia del ala el que va asociado al sexo. La explicación más simple es que los alelos para alas transparentes (*D*) y alas oscuras (*d*) están situados en el cromosoma X, puesto que vimos en el Capítulo 2 que la presencia de un gen en ese cromosoma produce un patrón de herencia en correlación con el sexo. Si esta propuesta es cierta, quien alberga el alelo *d* debería ser el parental femenino, ya que de ser el macho quien llevara ese alelo, tendría las alas oscuras, y el enunciado nos dice que sus alas eran transparentes. Así pues, el parental femenino sería *D/d* y el masculino *D*. Veamos si esta propuesta funciona: de ser cierta, todas las hembras descendientes habrían heredado el alelo *D* del padre, así que todas serían de alas transparentes. Esto es lo que se observa. La mitad de los descendientes machos serían *D* (de alas transparentes) y la otra mitad *d* (de alas oscuras), como también se observa.

En conjunto, podemos representar al parental femenino como *D/d* ; *L/l* y al parental masculino como *D* ; *l/l*. Así, la descendencia sería:

Hembras

$\frac{1}{2}$ *D/D* → $\frac{3}{4}$ *L/–* → $\frac{3}{8}$ *D/D* ; *L/–*
$\frac{1}{2}$ *D/D* → $\frac{1}{4}$ *l/l* → $\frac{1}{8}$ *D/D* ; *l/l*
$\frac{1}{2}$ *D/d* → $\frac{3}{4}$ *L/–* → $\frac{3}{8}$ *D/d* ; *L/–*
$\frac{1}{2}$ *D/d* → $\frac{1}{4}$ *l/l* → $\frac{1}{8}$ *D/d* ; *l/l*

$\frac{3}{4}$ Transparentes, alargadas
$\frac{1}{4}$ Transparentes, recortadas

Machos

$\frac{1}{2}$ *D* → $\frac{3}{4}$ *L/–* → $\frac{3}{8}$ *D* ; *L/–* Transparentes, alargadas
$\frac{1}{2}$ *D* → $\frac{1}{4}$ *l/l* → $\frac{1}{8}$ *D* ; *l/l* Transparentes, recortadas
$\frac{1}{2}$ *d* → $\frac{3}{4}$ *L/–* → $\frac{3}{8}$ *d* ; *L/–* Oscuras, alargadas
$\frac{1}{2}$ *d* → $\frac{1}{4}$ *l/l* → $\frac{1}{8}$ *d* ; *l/l* Oscuras, recortadas

b. En general, un buen modo de comprobar un modelo co éste es diseñar un cruzamiento y predecir su resultado. ¿Q cruzamiento? Hemos de predecir algún tipo de razón matem tica en la descendencia, así que interesa hacer un cruzamien del que pueda asegurarse una única razón matemática en distintos fenotipos. Observe que usar una de las hembras de cendientes no cumpliría ese requisito: de la observación d fenotipo de cualquiera de las hembras, no podemos inferir genotipo. Una hembra de alas transparentes podría ser *D/D* *D/d*, y una de alas alargadas podría ser *L/L* o *L/l*. Una bue idea sería cruzar el parental femenino del cruzamiento origin con un descendiente macho de alas oscuras y recortadas, ya qu según el modelo propuesto, el genotipo completo de ambos es ría perfectamente especificado; según dicho modelo, este cruz miento sería:

D/d ; *L/l* × *d* ; *l/l*

De este cruzamiento, podemos predecir la siguiente desce dencia:

Hembras

$\frac{1}{2}$ *D/d* → $\frac{1}{2}$ *L/l* → $\frac{1}{4}$ *D/d* ; *L/l*
$\frac{1}{2}$ *D/d* → $\frac{1}{2}$ *l/l* → $\frac{1}{4}$ *D/d* ; *l/l*
$\frac{1}{2}$ *d/d* → $\frac{1}{2}$ *L/l* → $\frac{1}{4}$ *d/d* ; *L/l*
$\frac{1}{2}$ *d/d* → $\frac{1}{2}$ *l/l* → $\frac{1}{4}$ *d/d* ; *l/l*

Machos

$\frac{1}{2}$ *D* → $\frac{1}{2}$ *L/l* → $\frac{1}{4}$ *D* ; *L/l*
$\frac{1}{2}$ *D* → $\frac{1}{2}$ *l/l* → $\frac{1}{4}$ *D* ; *l/l*
$\frac{1}{2}$ *d* → $\frac{1}{2}$ *L/l* → $\frac{1}{4}$ *d* ; *L/l*
$\frac{1}{2}$ *d* → $\frac{1}{2}$ *l/l* → $\frac{1}{4}$ *d* ; *l/l*

PROBLEMAS RESUELTOS

Se estudian dos plantas de maíz; una es *A/a* y la otra *a/a*. Se cruzan entre sí de dos maneras distintas: empleando *A/a* como parental femenino y *a/a* como masculino, y al revés. Consulte la Figura 3-22 y recuerde que el endospermo es $3n$ y se forma por la unión del núcleo de una célula espermática con los dos núcleos polares del gametofito femenino.

a. ¿Cuáles serán los genotipos del endospermo en cada cruzamiento? ¿En qué proporciones?

b. En un experimento para estudiar el efecto de la «dosis génica», desea obtener endospermos de genotipos *a/a/a*, *A/a/a*, *A/A/a* y *A/A/A* (portadores de 0, 1, 2 y 3 «dosis» de *A*, respectivamente). ¿Qué cruzamientos llevaría a cabo para obtener esos genotipos en el endospermo?

♦ Solución ♦

a. En un problema como éste, debemos tener en cuenta a la la meiosis y la mitosis. Las meiosporas son los productos de meiosis; los núcleos de los gametofitos masculinos y femenin de las plantas superiores se producen por división mitótica de núcleos de las meiosporas. Hemos de conocer también el ci de vida del maíz para saber qué núcleos se fusionan para form el endospermo.

Primer cruzamiento: *A/a* ♀ × *a/a* ♂

En este caso, las esporas producidas tras la meiosis femen serán la mitad *A* y la otra mitad *a*. Se producirá, por tanto mismo número de gametofitos femeninos. Sus núcleos serán

dos A o todos a, ya que la mitosis produce genotipos idénticos. De la misma manera, los núcleos de cada gametofito masculino serán a. En el ciclo de vida del maíz, el endospermo se forma por la unión de dos núcleos femeninos y un núcleo masculino, de modo que aparecerán dos tipos de endospermo:

♀ Esporas	♀ Núcleos polares	Células espermáticas	Endoespermo 3n
$\frac{1}{2}$ A	A y A	a	$\frac{1}{2}$ $A/A/a$
$\frac{1}{2}$ a	a y a	a	$\frac{1}{2}$ $a/a/a$

Segundo cruzamiento: a/a ♀ × A/a ♂

♀ Esporas	♀ Núcleos polares	♂ Células espermáticas	Endospermo 3n
todas a	todas a y a	$\frac{1}{2}$ A	$\frac{1}{2}$ $A/a/a$
		$\frac{1}{2}$ a	$\frac{1}{2}$ $a/a/a$

Las proporciones fenotípicas del carácter del endospermo serían aún mendelianas, aunque los genotipos subyacentes de los endospermos serían ligeramente diferentes. (Estos problemas no se presentan en el caso de caracteres del embrión, que es diploide.)

b. Este tipo de experimento ha sido muy útil en el estudio de la genética y la biología molecular de plantas. Todo lo que necesitamos saber para responder a esta pregunta es que los dos núcleos polares que contribuyen a la formación del endospermo son genéticamente idénticos. Para que todos los endospermos obtenidos sean $a/a/a$, valdrá cualquier cruzamiento a/a × a/a. Para que todos los endospermos sean $A/a/a$, el cruzamiento ha de ser a/a ♀ × A/A ♂. Para que todos los endospermos sean $A/A/a$, el cruzamiento ha de ser A/A ♀ × a/a ♂. Para endospermos $A/A/A$, valdrá cualquier cruzamiento A/A × A/A. Se pueden obtener estos mismos genotipos en el endospermo mediante otros cruzamientos, pero siempre en combinación con otros genotipos distintos.

PROBLEMAS

1. Señale la función clave de la mitosis.

2. Señale las dos funciones claves de la meiosis.

3. ¿Puede diseñar un sistema de división nuclear diferente en el que se obtenga el mismo resultado que en la meiosis?

4. En un futuro panorama posible, la fertilidad de los varones se reduce a cero. Afortunadamente, los científicos desarrollan un método para que las mujeres puedan tener bebés permaneciendo vírgenes. El meiocito podría convertirse directamente en cigoto, que se implantaría de forma normal. ¿Cuáles serían los efectos a corto y a largo plazo en una sociedad así?

5. ¿En qué se diferencian la segunda división meiótica y la mitosis?

6. Una célula diploide de genotipo A/a ; B/b lleva a cabo una mitosis normal. ¿Cuáles de los siguientes fenotipos representan las posibles células hijas? A ; B, a ; b, A ; b, a ; B, A/A ; B/B, A/a ; B/b, a/a ; b/b.

7. En un intento de simplificar la meiosis en beneficio de los estudiantes, unos científicos locos desarrollan un mecanismo que carece de fase S premeiótica y en el que la meiosis consta de una sola división, la cual comprende el apareamiento de cromosomas, su entrecruzamiento y su segregación. ¿Funcionaría este sistema de división? y ¿existirían diferencias entre los productos de dicho sistema y los del sistema de división normal?

8. Suponga que en un organismo diploide, en el cual $2n = 5$, puede marcar todos los centrómeros procedentes del parental femenino y todos los procedentes del parental masculino. Si este organismo produce gametos, ¿cuántas parejas distintas de centrómeros masculinos y femeninos marcados aparecerán en los gametos?

9. En el maíz, se realizaron medidas de contenido de DNA (en unidades de absorción de luz) en varios núcleos. Los resultados fueron:

   0.7, 1.4, 2.1, 2.8 y 4.2

   ¿Qué células pudieron ser utilizadas para obtener estos resultados?

10. Cierta especie de alga marina muestra alternancia de generaciones, pero su fase diploide es muy parecida a su fase haploide. Se obtuvo un mutante rojo a partir de la especie normal marrón. El mutante rojo se colocó en un contenedor junto a un individuo marrón escogido al azar. Al poco tiempo, empezaron a aparecer nuevas plantas, la mitad de las cuales eran rojas y la otra mitad marrones. Proponga una explicación para este resultado.

11. Dibuje el esquema de una mitosis haploide, al estilo de la Figura 3-18, en un individuo de genotipo a^+ ; b.

12. La planta *Haplopappus gracilis* contiene un número $2n = 4$. Se puso un cultivo de células diploides y, en la fase S premitótica, se añadió un nucleótido radioactivo que se incorporó en el DNA recién sintetizado. Las células se retiraron de la mezcla radiactiva, se lavaron y se dejó que transcurriera la mitosis. Los cromosomas y las cromátidas radioactivas pueden detectarse colocando una emulsión fotográfica sobre las células; las cromátidas y los cromosomas radioactivos aparecen cubiertos de puntos de plata procedentes de la emulsión (los cromosomas «hacen su propia fotografía»). Dibuje los cromosomas en la profase y la telofase de la primera y segunda divisiones mitóticas tras el tratamiento radioactivo. Si son radioactivos, indíquelo en su esquema. Si existen varias posibilidades, indíquelas también.

13. En la misma especie del Problema 12, usted introduce la radioactividad en las anteras por inyección durante la fase

S antes de la meiosis. Dibuje los cuatro productos de la meiosis con sus cromosomas, e indique cuáles son radioactivos.

14. El guisante es diploide, siendo $2n = 14$. *Neurospora* es haploide, siendo $n = 7$. Si se separa su DNA genómico mediante electroforesis de campo pulsante, ¿cuántas bandas se observarán para cada una de las dos especies?

15. El haba gruesa (*Vicia faba*) es diploide, siendo $2n = 18$. Cada serie haploide de cromosomas contiene aproximadamente 4 m de DNA. El tamaño medio de cada cromosoma durante la metafase de la mitosis es de 13 μm. ¿Cuál es el grado medio de empaquetamiento del DNA en la metafase? (Grado de empaquetamiento = longitud del cromosoma con respecto a la longitud de la molécula de DNA contenida en él) ¿Cómo se logra ese grado de empaquetamiento?

16. Boveri dijo, «El núcleo no divide; se divide» ¿Dónde quería llegar con esa afirmación?

17. Galton, un genetista de la era pre-mendeliana, propuso el principio de que la mitad de nuestra dotación genética procede de cada uno de los padres, un cuarto de cada abuelo, un octavo de cada bisabuelo y así sucesivamente. ¿Tenía razón? Explique por qué.

18. Si los niños obtienen la mitad de sus genes de uno de los padres y la otra mitad del otro, ¿por qué los hermanos no son idénticos?

19. La doble hélice de DNA de los cromosomas puede desenrollarse parcialmente *in situ* mediante tratamientos especiales.

a. Si una preparación de ese tipo se baña en una sonda radioactiva específica de un único gen, ¿qué patrón de radioactividad se esperaría?

b. Si dicha preparación se baña en una sonda específica de DNA repetido disperso, ¿qué patrón de radioactividad se esperaría?

c. Si dicha preparación se baña en una sonda específica de DNA ribosómico, ¿qué patrón de radioactividad se esperaría?

20. Si se digiere DNA genómico con una enzima de restricción y los fragmentos resultantes se separan por tamaño mediante elecroforesis, ¿qué patrón de hibridación Southern se esperaría para los tres tipos de sonda del Problema 19?

21. En el maíz, el alelo s produce un endospermo azucarado, mientras que S produce un endospermo de almidón. ¿Qué genotipos resultantes producirían en el endospermo los cruzamientos siguientes?

hembra s/s × macho S/S
hembra S/S × macho s/s
hembra S/s × macho S/s

22. En el maíz, el alelo f' produce un endospermo harinoso y f'' produce un endospermo grumoso. En el cruzamiento f'/f' ♀ × f''/f'' ♂, todos los endospermos de la descendencia son harinosos, mientras que en los cruzamientos de prueba, todos los endospermos de la descendencia son grumosos. Dé una explicación posible. (Revise el ciclo de vida del maíz.)

23. En el musgo, los genes A y B se expresan sólo en el gametofito. Se deja que un esporofito de genotipo A/a ; B/b produzca gametofitos.

a. ¿Qué proporción de gametofitos será A ; B?

b. Si la fecundación se produce al azar, ¿qué proporción de esporofitos de la siguiente generación será A/a ; B/b?

24. Si se divide por mitosis una célula de genotipo A/a ; B/b ; C/c, estando cada uno de estos genes en un par cromosómico distinto, ¿cuáles serán los genotipos de las células hijas?

25. Trabajando con una levadura haploide, usted cruza una estirpe púrpura (ad^-), de tipo sexual a con una estirpe blanca (ad^+), de tipo sexual α. Si ad^- y ad^+ son alelos de un mismo gen, y a y α son alelos de otro gen que se hereda independientemente en un par cromosómico distinto ¿Qué descendientes espera obtener? ¿En qué proporciones?

26. Indique dónde se producen la mitosis y la meiosis en: un helecho, un musgo, una planta con flor, un pino, un champiñón, una rana, una mariposa y un caracol.

27. Las células humanas tienen normalmente 46 cromosomas. Indique el número de cromosomas presentes en una célula humana en cada una de las etapas siguientes:

a. metafase de la mitosis

b. metafase I de la meiosis

c. telofase de la mitosis

d. telofase I de la meiosis

e. telofase II de la meiosis

(En sus respuestas, cuente las cromátidas como cromosomas).

28. Cuatro de los fenómenos que se indican a continuación ocurren tanto en la mitosis como en la meiosis, pero uno de ellos ocurre sólo en la meiosis. ¿Cuál es? (1) Formación de las cromátidas, (2) formación del huso, (3) condensación de los cromosomas, (4) desplazamiento de los cromosomas hacia los polos, (5) apareamiento cromosómico.

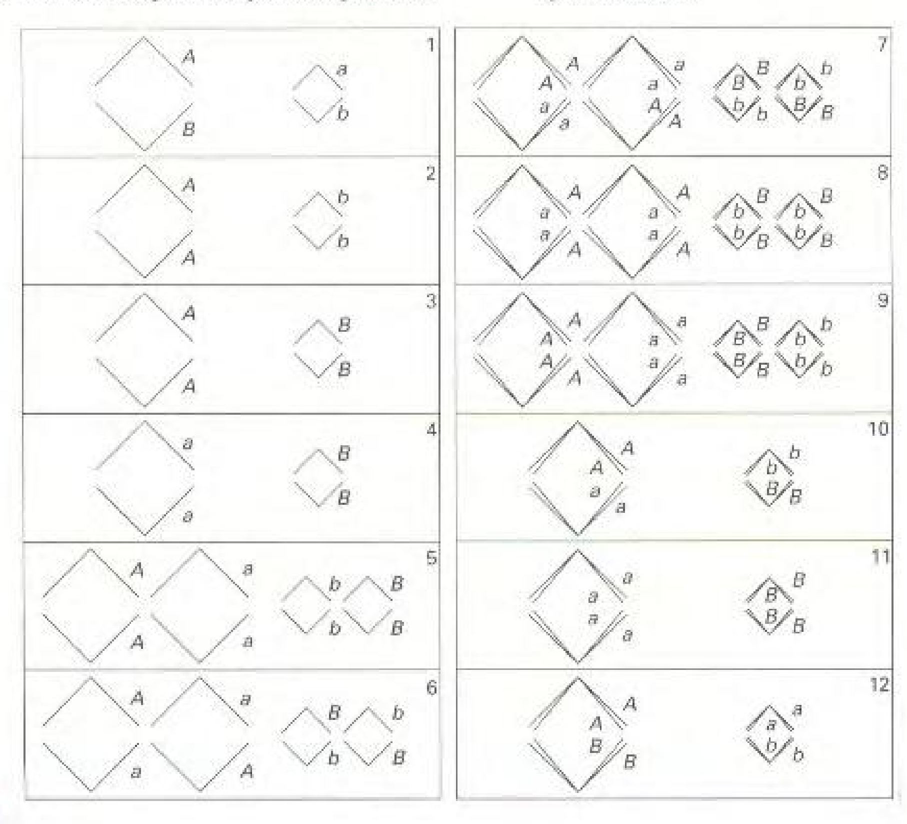
29. Suponga que descubre dos interesantes anomalías citológicas raras en el cariotipo de un hombre (un cariotipo es la dotación completa de cromosomas visibles). Encuentra un fragmento extra (o satélite) en uno de los cromosomas del par 4 y un patrón de tinción anormal en uno de los cromosomas del par 7. Suponiendo que todos los gametos de este hombre son igualmente viables, ¿qué proporción de sus hijos tendrá el mismo cariotipo que él?

30. Supongamos que se produce meiosis en el estado diploide transitorio del ciclo de vida de un organismo haploide, cuyo número cromosómico es n. ¿Cuál es la probabilidad de que un individuo haploide resultante herede una dota-

ción completa de cromosomas parentales (es decir, una dotación que procede toda ella de uno u otro de los parentales)?

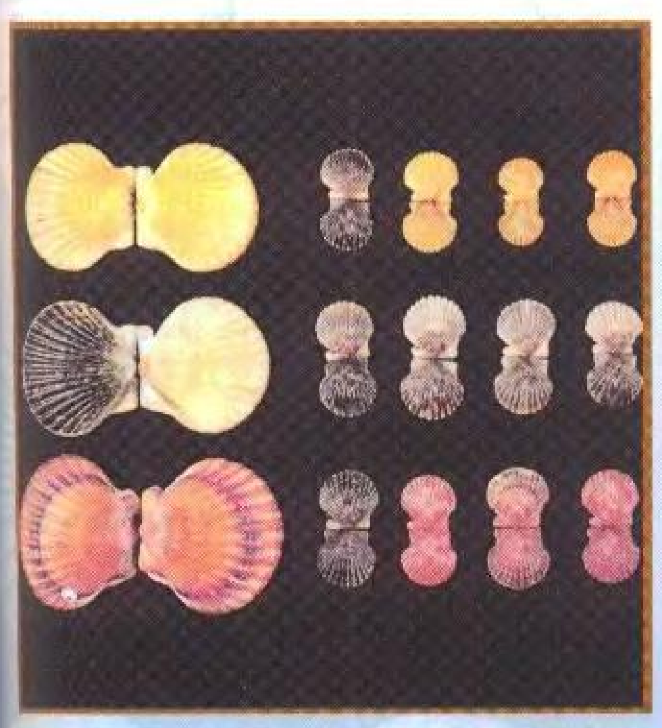
31. Imagine que nos encontramos en el año 1868. Usted es un joven experto en la fabricación de lentes que trabaja en Viena. Con la última y magnífica lente de su creación, acaba de construir un microscopio con mayor poder de resolución que ningún otro conocido. Para probar el microscopio, ha estado observando células de testículos de saltamontes y ha quedado fascinado por la conducta de extrañas estructuras alargadas que ha visto en aquellas células que estaban en división. Un día lee en la biblioteca un artículo reciente de un tal G. Mendel sobre «factores» hipotéticos que, según él, explican los resultados de ciertos cruzamientos con guisantes. En una revelación repentina, queda sorprendido del paralelismo entre sus estudios con el saltamontes y las proposiciones de Mendel, y decide escribirle una carta. ¿Qué le escribiría? (Problema basado en una idea de Ernest Kroeker.)

32. La planta *Haplopappus gracilis* es diploide, siendo $2n = 4$. Contiene un par de cromosomas largos y otro corto. El esquema de abajo representa anafases (fases de separación cromosómica) de células individuales en meiosis o mitosis de una planta dihíbrida para dos genes situados en distintos cromosomas (A/a ; B/b). Las líneas representan cromosomas o cromátidas, y las puntas de las V representan centrómeros. Determine en cada caso si el esquema corresponde a una célula en meiosis I, meiosis II o mitosis. Si un esquema representa una situación imposible de resolver, indíquelo también.



4

Interacciones génicas



La variación de la coloración de las valvas de la vieira *Argopecten irradians* se debe a tres alelos de un mismo gen. Los colores amarillo, negro y naranja están determinados por los alelos p^y, p^b y p^o, respectivamente. Los grupos de valvas pequeñas que aparecen en la figura representan las proporciones obtenidas tras la autofecundación de individuos del genotipo p^y/p^b (fila superior), p^b/p^b (fila intermedia) y p^o/p^b (fila inferior). Estos resultados ponen de manifiesto las relaciones alélicas y demuestran que tanto p^y como p^o dominan sobre p^b. (Tomado de L. Adamkewicz y M. Castagna, *Journal of Heredity* 79, 1988. 15/BPS.)

Ideas fundamentales

- Si se combinan en una célula dos genomas haploides, cada uno de los cuales es portador de una mutación recesiva distinta, y el fenotipo resultante es mutante, las mutaciones deben estar en el mismo gen (mutaciones alélicas).
- Si se combinan en una célula dos genomas haploides, cada uno de los cuales es portador de una mutación recesiva distinta, y el fenotipo resultante es silvestre, las mutaciones deben estar en genes diferentes.
- Algunos heterocigotos muestran fenotipos que revelan la existencia de tipos de dominancia distintos a la dominancia completa.
- Algunos alelos mutantes pueden causar la muerte del organismo.
- La mayoría de los caracteres están determinados por series de genes que interactúan entre ellos y con el medio ambiente.
- Las interacciones alélicas provocan cambios en las proporciones monohíbridas.
- Las interacciones génicas provocan cambios en las proporciones dihíbridas.

En los capítulos precedentes se ha destacado el papel desempeñado por los genes de forma individual. Hemos examinado los patrones hereditarios de genes aislados, deduciendo las leyes que gobiernan esta herencia. También hemos observado los procesos celulares mediante los cuales un gen individual puede afectar al fenotipo. Pero ya es tiempo de prestar atención al hecho de que los genes establecen distintas interrelaciones. Un gen individual no puede efectuar ninguna función biológica por sí solo; debe actuar en un contexto celular determinado por la acción de muchos otros genes y del medio ambiente.

De los genes a los fenotipos

A cierto nivel, los genetistas tienden a pensar en los genes como entes aislados. Consideremos que cada vez que realizamos un cruzamiento entre una estirpe de *Drosophila* de ojos rojos (silvestre) y una estirpe mutante de ojos blancos, cada parental y cada descendiente contiene unos 20 000 genes. Sin embargo, en el cruzamiento como tal, sólo apreciaríamos el modo de segregación de la diferencia genética que nos ocupa, el color del ojo de cada mosca. En realidad, los genes no actúan de forma aislada. Los RNA y proteínas que cifran forman parte de rutas celulares específicas de las que también forman parte los productos de muchos otros genes. Es más, la expresión de un gen individual depende de muchos factores, entre los que destaca el fondo genético de las moscas y una gran variedad de condiciones ambientales: temperatura, estado nutricional, densidad de población, etc. Tal dependencia de la expresión génica respecto a factores ambientales ya se trató en el Capítulo 1, en el apartado de la norma de reacción.

Acción génica es un término que cubre una serie muy compleja de acontecimientos y, probablemente, no existe ni un solo caso en que entendamos todos los sucesos acaecidos desde el nivel de la expresión de un gen concreto hasta el nivel del fenotipo de un organismo. En este capítulo, consideraremos algunos de los métodos que los genetistas utilizan para desvelar los mecanismos que conectan los genes con los fenotipos finales. Podemos comenzar estableciendo un par de generalizaciones sobre la complejidad de la acción génica.

1. *Existe una relación «un gen : muchos fenotipos».* Esta relación se conoce como *pleiotropía.* Se infiere al observar que determinadas mutaciones seleccionadas por su efecto sobre un carácter específico afectan a menudo a otros caracteres del organismo. Esto podría significar que existen diversas rutas fisiológicas relacionadas que desembocan en un fenotipo similar en varios tejidos. Por ejemplo, la mutación de ojos blancos en *Drosophila* no sólo resulta en la carencia de pigmentación en los ojos compuestos, sino también en los ocelos (ojos simples), en las capas de tejido que rodean las gónadas masculinas y en los túbulos de Malpigio (los riñones de la mosca). En todos estos tejidos, la formación del pigmento requiere la incorporación al interior de la célula de moléculas precursoras del pigmento. El alelo «blanco» provoca un defecto en dicha incorporación, quedando bloqueada por consiguiente la formación del pigmento en todos estos tejidos.

   A menudo, en la pleiotropía están implicados sucesos diversos que no presentan una relación fisiológica obvia. Por ejemplo, la mutación dominante *Dichaete* de *Drosophila* provoca que las alas de la mosca se mantengan abiertas lateralmente, pero también ocasiona la carencia de ciertos pelos en el dorso; además, la mutación es letal en homocigosis. Este ejemplo ilustra la dificultad a la hora de clasificar las mutaciones como recesivas o dominantes. La realidad es que una mutación concreta puede ser a la vez recesiva y dominante dependiendo de qué aspectos de su fenotipo pleiotrópico se consideren. En general, la terminología genética no llega a representar este nivel de pleiotropía y complejidad en un solo símbolo y, como trataremos más adelante, existe cierta arbitrariedad en el modo de denominar los alelos o influyen en ello criterios históricos. En este capítulo consideraremos algunas variaciones sobre el tema dominancia-recesividad y algunas de las formas tradicionales de nombrar los alelos.

2. *Existe una relación «un fenotipo: muchos genes».* Esta idea inversa a la que acabamos de desarrollar, se basa en la observación de que muchos genes distintos pueden influir sobre un fenotipo concreto. Este concepto es sencillo de entender si consideramos un carácter como el color del ojo, para el que se requiere el funcionamiento de una ruta metabólica compleja, con numerosos pasos enzimáticos, que a su vez se encuentran regulados por uno o más productos génicos. Así, en *Drosophila*, se calcula que hay 100 genes o más implicados en la pigmentación del ojo compuesto de la mosca. En el caso de procesos aún más complejos, tales como el desarrollo de la estructura del propio ojo compuesto, probablemente participen muchos cientos de genes.

   Un objetivo del análisis genético es identificar todos los genes que afectan a un fenotipo específico y comprender qué papel desempeña cada uno de ellos a nivel genético, celular, molecular y en el contexto del desarrollo. Para hacerlo necesitamos métodos de clasificación de mutaciones y genes. En el primer apartado de este capítulo, trataremos sobre cómo utilizar el análisis genético para determinar si dos mutantes se encuentran afectados por mutaciones en el mismo gen (es decir, si éstas son alélicas) o en genes distintos. Más adelante consideraremos cómo se puede usar el análisis genético para realizar inferencias acerca de cómo los genes interaccionan en rutas bioquímicas y de desarrollo.

Prueba de alelismo

Muchos programas de investigación genética se llevan a cabo con objeto de entender qué genes participan en un determinado proceso biológico. Tales análisis suelen comenzar con una colección de fenotipos mutantes relacionados en torno a un proceso concreto. Por ejemplo, si un genetista estuviera interesado en los genes que determinan la locomoción en un gusano nematodo, la disección genética habría de comenzar por el aislamiento de una serie de mutantes que presentaran defectos en la locomoción. Una tarea importante es determinar cuántos genes distintos

se hallan representados por las mutaciones que definen los distintos fenotipos relacionados, porque este número define la serie de genes que afectan al proceso en estudio. Así pues, es necesario contar con una prueba que nos indique si las mutaciones son alélicas o pertenecientes a genes distintos. La prueba de alelismo más utilizada es la **prueba de complementación**, que se explica con el ejemplo siguiente.

Consideremos una especie de campanilla (*Campanula*) en la que el color silvestre es el azul. Supongamos que, mediante la aplicación de una radiación mutágena, inducimos la aparición de tres mutantes de pétalos blancos, y que son todos líneas puras homocigotas. Podemos denominar a las estirpes mutantes \$, £ y ¥, usando símbolos de monedas para evitar cualquier prejuicio respecto a sus relaciones de dominancia-recesividad. Cuando se cruzan con la estirpe silvestre, cada mutante produce los mismos resultados en la F_1 y en la F_2, como se muestra a continuación:

\$ blanca × azul → F_1, todas azules → F_2 $\frac{3}{4}$ azul, $\frac{1}{4}$ blanco
£ blanca × azul → F_1, todas azules → F_2 $\frac{3}{4}$ azul, $\frac{1}{4}$ blanco
¥ blanca × azul → F_1, todas azules → F_2 $\frac{3}{4}$ azul, $\frac{1}{4}$ blanco

En cada caso, los resultados muestran que la condición de mutante se ve determinada por el alelo recesivo de un solo gen. No obstante, ¿son los tres alelos del mismo gen, de dos genes o de tres genes distintos? Podemos responder a esto preguntándonos si los mutantes complementan entre sí. Pero primero definamos qué es la complementación.



Una campanilla (género *Campanula*). (Gregory G. Dimijian/Photo Researchers.)

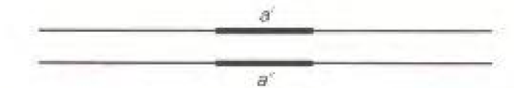
COROLARIO

Complementación es la aparición de un fenotipo silvestre cuando se reúnen en una misma célula dos alelos mutantes recesivos.

(La demostración de la naturaleza recesiva de los mutantes individuales es un resultado crucial que nos permite proseguir en una prueba de complementación. Las mutaciones dominantes no pueden emplearse en este tipo de ensayos).

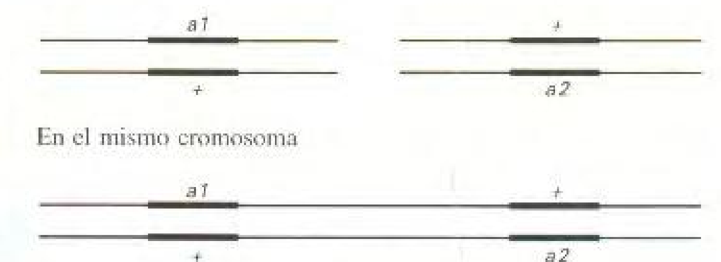
En un organismo diploide, la prueba de complementación se efectúa cruzando los mutantes homocigotos recesivos entre sí (dos a dos) y comprobando si la descendencia presenta o no fenotipo silvestre.

Las dos mutaciones, presentes en gametos haploides, se reúnen para formar el núcleo diploide de una célula (el cigoto). Si las mutaciones recesivas constituyen alelos del mismo gen, obviamente no complementarán porque ambas mutaciones suponen la pérdida de la función del mismo gen. Generalmente podemos describir tales alelos como a' y a'', empleando las siglas prima para diferenciar entre diferentes alelos mutantes del alelo silvestre a^+. Estos alelos pueden estar mutados en lugares distintos del gen pero serían funcionalmente idénticos. El heterocigoto a'/a'' sería:



Sin embargo, dos mutaciones recesivas en genes diferentes presentarían una función silvestre aportada por los dos alelos silvestres. En este caso podemos denominar las mutaciones como los respectivos alelos mutantes, *a1* y *a2*; y, dependiendo de si los genes están o no en cromosomas diferentes, podemos representar los heterocigotos de la siguiente forma:

En cromosomas diferentes



En el mismo cromosoma

Volvamos al ejemplo de la campanilla y crucemos los mutantes para probar la complementación. Supongamos que los resultados de cruzar los mutantes son los siguientes:

\$ blanca × £ blanca → F_1, todas blancas
\$ blanca × ¥ blanca → F_1, todas azules
£ blanca × ¥ blanca → F_1, todas azules

A partir de estos resultados, podemos concluir que los mutantes \$ y £ deben estar causados por alelos del mismo gen (llamémosle *w1*) porque no complementan, pero ¥ debe estar causado por un alelo mutante de otro gen (*w2*).

A menudo, la explicación molecular de tales resultados viene dada en términos de rutas bioquímicas. ¿Cómo funciona la com-

plementación a nivel molecular? Aunque convencionalmente se suele hablar de *mutantes* que complementan, de hecho los agentes activos de la complementación son las proteínas producidas por los alelos *silvestres*. El color azul normal de la flor está causado por la deposición de un pigmento azul conocido como antocianina. Los pigmentos son sustancias químicas que absorben luz de ciertas partes del espectro visible; en el caso de la campanilla, la antocianina absorbe luz de todas las longitudes de onda excepto el azul, que se refleja y lo puede percibir el ojo humano. Sin embargo, la antocianina se forma a partir de precursores químicos que no son pigmentos; es decir, no absorben luz de ninguna longitud de onda específica y simplemente reflejan la luz blanca del sol, lo cual les da una apariencia blanca. El pigmento azul es el producto final de una serie de conversiones bioquímicas de precursores no pigmentados. Cada paso está catalizado por una enzima específica cifrada por un gen concreto. Los resultados anteriores serían coherentes con una ruta como:

gen $w1^+$ → enzima 1; gen $w2^+$ → enzima 2

→ precursor 1 → (enzima 1) precursor 2 → (enzima 2) antocianina azul

Una mutación en homocigosis en cualquiera de los genes llevará a la acumulación de un precursor, lo que hará que la planta sea blanca. Ahora, podemos designar a los mutantes como:

$ \quad w1_\$/w1_\$ \cdot w2^+/w2^+$

£ $\quad w1_£/w1_£ \cdot w2^+/w2^+$

¥ $\quad w1^+/w1^+ \cdot w2_¥/w2_¥$

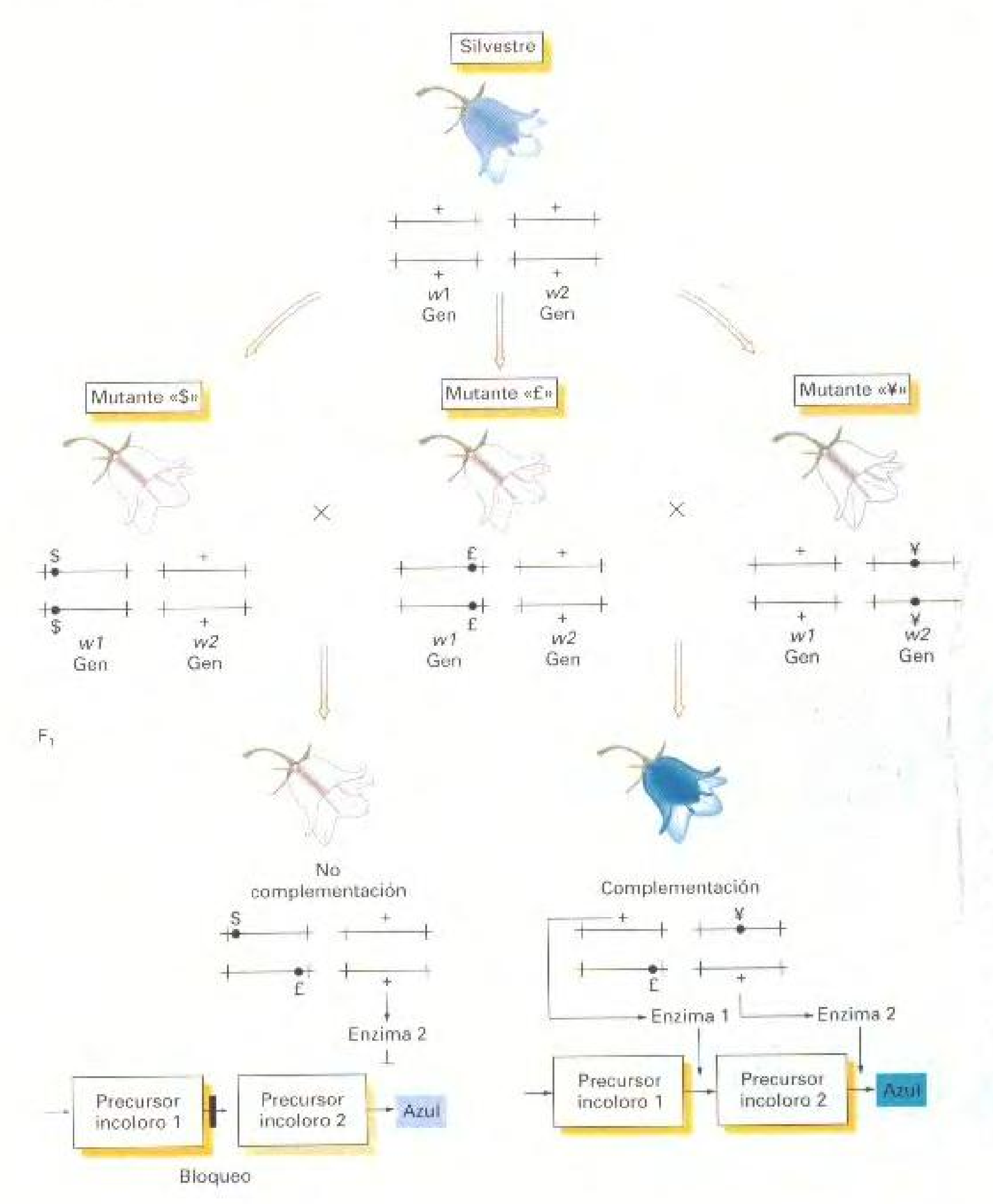


Figura 4-1. Base molecular de la complementación genética. Se cruzan entre sí tres mutantes blancos fenotípicamente iguales, $, £ y ¥, para formar heterocigotos cuyos fenotipos indican si las mutaciones complementan (sólo se muestran dos de los tres posibles cruzamientos). Si dos mutaciones están en genes diferentes (como £ y ¥), la complementación hace que la ruta bioquímica se complete (en este ejemplo el producto final es un producto azul). Si las mutaciones están en el mismo gen (como $ y £), la complementación no ocurre porque la ruta bioquímica queda bloqueada en el paso controlado por dicho gen y los intermediarios de la ruta son incoloros (blancos). ¿Cuál cree que sería el resultado de cruzar $ y ¥?

En la práctica, podemos obviar los subíndices y describir los genotipos como:

$ $\quad$ $w1/w1 \cdot w2^+/w2^+$
£ $\quad$ $w1/w1 \cdot w2^+/w2^+$
¥ $\quad$ $w1^+/w1^+ \cdot w2/w2$

Por tanto, una F_1 de $ × £ será:

$$w1/w1 \cdot w2^+/w2^-$$

que tendrá dos alelos defectuosos para *w1* y estará bloqueada por tanto en el paso 1 de la ruta. Aunque la enzima 2 sea completamente funcional, no tiene sustrato sobre el que actuar, de modo que no se producirá pigmento azul y el fenotipo será blanco.

Sin embargo, las F_1 de los otros cruzamientos tendrán alelos silvestres para las dos enzimas necesarias para llevar a cabo las conversiones que producen pigmento azul. Sus genotipos serán:

$$w1^+/w1 \cdot w2^+/w2$$

Así, podemos ver por qué la complementación es realmente el resultado de la acción cooperativa entre los alelos silvestres de los dos genes. En la Figura 4-1 se muestra un resumen esquemático de las interacciones entre los mutantes que complementan y los que no complementan.

En un organismo haploide, la prueba de complementación no se puede realizar mediante cruzamientos. En los hongos, una alternativa a la prueba de complementación es construir un **heterocarionte** (Fig. 4-2). Las células de los hongos se fusionan rápidamente y, cuando se fusionan dos estirpes diferentes, los núcleos haploides de las diferentes estirpes ocupan la misma célula, a la que se denomina heterocarionte (del griego, núcleos diferentes). Los núcleos de un heterocarionte generalmente no se fusionan. En cierto sentido, esta situación es una imitación de un verdadero estado diploide. Supongamos que en dos estirpes diferentes hay mutaciones en genes distintos que producen el mismo fenotipo mutante, por ejemplo, requerimiento de arginina. Podemos llamar *arg-1* y *arg-2* a estos genes. Ambas estirpes, cuyos genotipos se pueden representar como $arg\text{-}1 \cdot arg\text{-}2^+$ y $arg\text{-}1^+ \cdot arg\text{-}2$, se pueden fusionar y formar un heterocarionte con los dos núcleos en un citoplasma común:

Núcleo 1: $arg\text{-}1 \cdot arg\text{-}2^+$
Núcleo 2: $arg\text{-}1^+ \cdot arg\text{-}2$

Como la expresión génica tiene lugar en el citoplasma, los dos alelos silvestres pueden ejercer su efecto dominante y cooperar para dar lugar a un heterocarionte de fenotipo silvestre. Dicho de otra forma, las dos mutaciones complementan exactamente igual que lo harían en un diploide. Si las mutaciones se correspondieran con alelos del mismo gen, la complementación no tendría lugar.

COROLARIO

Cuando dos alelos mutantes recesivos obtenidos de forma independiente y que producen fenotipos parecidos no complementan, los alelos corresponden al mismo gen. Si complementan, pertenecen a genes diferentes.

Interacciones entre alelos de un gen

Los alelos de un gen pueden interactuar de muchas formas distintas a nivel funcional, dando lugar a variaciones del tipo de dominancia y a efectos fenotípicos muy distintos en diferentes combinaciones alélicas.

Dominancia incompleta

La planta dondiego de noche es natural de América tropical. Su denominación inglesa (*four o'clock plant*, la «planta de las cuatro en punto») se debe a que sus flores se abren por la tarde. Cuando una planta de dondiego de noche de pétalos rojos se cruza con una línea pura de pétalos blancos, toda la F_1 tiene pétalos rosas. Si se produce una F_2 por cruzamiento de plantas de la F_1, el resultado es:

$\frac{1}{4}$ de las plantas de pétalos rojos
$\frac{1}{2}$ de las plantas de pétalos rosas
$\frac{1}{4}$ de las plantas de pétalos blancos

Figura 4-2. Formación de un heterocarionte de *Neurospora*, que pone de manifiesto tanto la complementación como la recesividad. Las células vegetativas de este hongo, normalmente haploide, pueden fusionarse, permitiendo que los núcleos de las dos estirpes coexistan en el mismo citoplasma. Si cada estirpe está bloqueada en un punto diferente de una ruta metabólica, como lo están los mutantes *arg-1* y *arg-2*, todas las funciones estarán presentes en el heterocarionte y éste podrá crecer; en otras palabras, se ha producido complementación. El crecimiento se debe a la presencia del alelo silvestre; así, los alelos mutantes *arg-1* y *arg-2* deben ser recesivos.



Los fenotipos rojo (c^+/c^+), rosa (c^+/c) y blanco (c/c) del dondiego de noche. La dominancia incompleta se manifiesta en el heterocigoto de color rosa (R. Calentine/Visuals Unlimited).

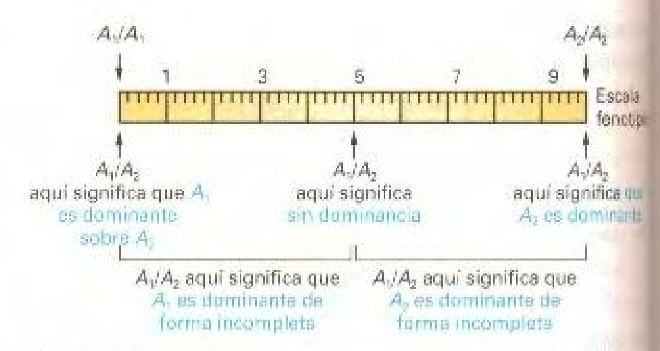


Figura 4-3. Resumen de las relaciones de dominancia. La regla repres[enta] algún tipo de medida fenotípica, como la cantidad de pigmento.

De la proporción 1:2:1 de la F_2 podemos deducir un patrón de herencia basado en la presencia de dos alelos del mismo gen. Sin embargo, los heterocigotos (la F_1 y la mitad de la F_2) presentan un fenotipo intermedio, lo que sugiere una forma incompleta de dominancia. Creando símbolos para los alelos, podemos designar los genotipos de las plantas de este experimento como c^+/c^+ (rojo), c/c (blanco) y c^+/c (rosa). La **dominancia incompleta** describe la situación general en la que el fenotipo de un heterocigoto es intermedio entre el de ambos homocigotos, según alguna escala de medida cuantitativa. En La Figura 4-3 aparecen todos los términos para todas las posiciones teóricas de la escala, aunque en la práctica es difícil determinar dónde se encuentra exactamente el heterocigoto. A nivel molecular, la dominancia incompleta está normalmente causada por un efecto cuantitativo del número de dosis del alelo silvestre; dos dosis producen más transcrito funcional y, por consiguiente, más cantidad de producto proteico funcional; una dosis produce menos transcrito y proteína, mientras que cero dosis no produce ningún transcrito ni proteína. Cuando se da dominancia completa, en el heterocigoto silvestre/mutante resulta que la producción de la mitad de la cantidad normal de transcrito es suficiente para la función normal de la célula (se dice que el gen es **haplosuficiente**), o bien que el alelo normal está regulado de tal manera que aumenta su actividad, generando la cantid[ad] normal de transcrito.

Codominancia

En la especie humana, los grupos sanguíneos del sistema AB[O] están determinados por tres alelos de un gen que muestra vari[os] tipos de interacciones para dar lugar a los cuatro grupos sangu[í]neos del sistema ABO. La serie alélica incluye los tres alelos i, I^A e I^B, aunque por supuesto, una persona sólo puede llevar dos de [los] tres alelos (o dos copias del mismo). Hay seis genotipos diferente[s]: los tres homocigotos y los tres diferentes tipos de heterocigotos.

Genotipo	Tipo sanguíneo
I^A/I^A, I^A/i	A
I^B/I^B, I^B/i	B
I^A/I^B	AB
i/i	O

En esta serie alélica, cada uno de los alelos I^A e I^B determina [la] presencia de un antígeno específico, el cual se deposita en la su[]perficie de los hematíes. Estos antígenos son en realidad dos fo[r]mas diferentes de la misma proteína. Sin embargo, el alelo i n[o] produce ninguna proteína antigénica. En los genotipos I^A/i e I^B/i, los alelos I^A e I^B, son completamente dominantes respecto a i. Sin embargo, en el genotipo I^A/I^B, cada uno de los alelos da lugar a s[u] propio antígeno y se dice de ellos que son **codominantes**.

Otro ejemplo interesante de relaciones de dominancia en [la] especie humana lo encontramos en la anemia falciforme (form[a] de hoz). El gen en cuestión codifica la molécula transportador[a] de oxígeno, hemoglobina, constituyente principal de los glóbu[]los rojos. Los tres genotipos presentan diferentes fenotipos:

Hb^A/Hb^A: Normal; los glóbulos rojos nunca se deforman.

Hb^S/Hb^S: Anemia grave, a menudo mortal; la hemoglobina anómala origina que los glóbulos rojos adopten forma de hoz.

Hb^A/Hb^S: Sin anemia; los glóbulos rojos se deforman sólo en condiciones de baja concentración de oxígeno.

En la Figura 4-4 se muestra una micrografía electrónica d[e] células falciformes. Respecto a la anemia, el alelo Hb^A es clara[]mente dominante. Sin embargo, en relación a la morfología de

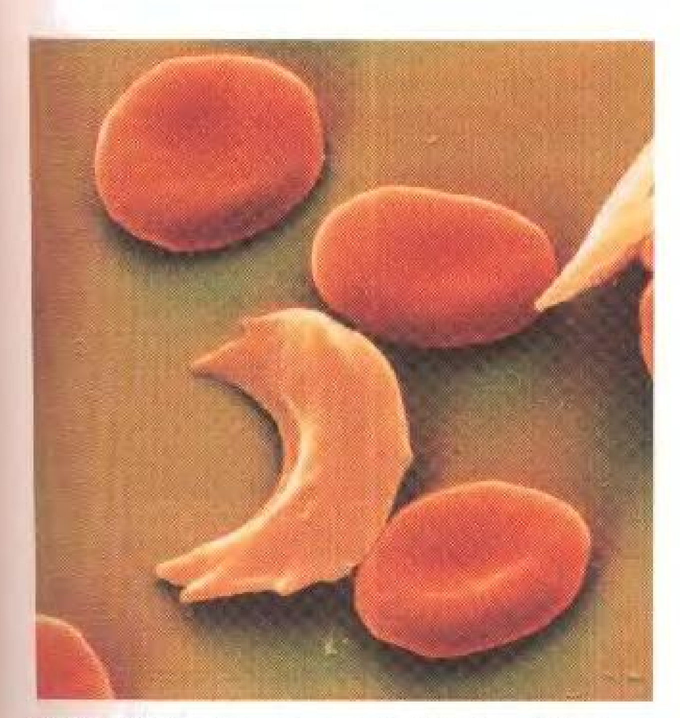


Figura 4-4. Fotografía con microscopio electrónico de un glóbulo rojo con forma de hoz (falciforme). Otros eritrocitos más redondeados presentan un aspecto casi normal (Meckes/Ottawa/Photo Researchers.)

lular existe dominancia incompleta. Por último, como veremos ahora, respecto a la propia hemoglobina hay codominancia. Los alelos Hb^A y Hb^S realmente codifican dos formas de hemoglobina que difieren en un solo aminoácido, y el heterocigoto produce ambas formas. Las diferentes formas de la hemoglobina pueden observarse utilizando la **electroforesis**, una técnica que separa macromoléculas que tengan diferente carga o tamaño (Fig. 4-5).

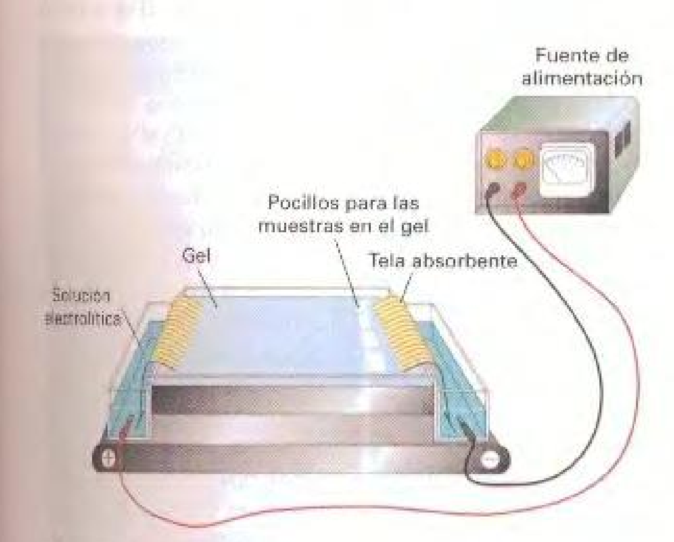


Figura 4-5. Equipo de electroforesis. Cada muestra se sitúa en un pocillo de una matriz gelatinosa (un gel). Las moléculas de la muestra se desplazan a diferentes distancias en el gel debido a sus diferentes cargas eléctricas. Pueden probarse varias muestras al mismo tiempo (cada una en un pocillo). Las posiciones a las que las muestras se han desplazado se observan posteriormente por tinción.

Sucede que las formas A y S de la hemoglobina poseen cargas diferentes, por lo que se pueden separar mediante electroforesis (Fig. 4-6). Vemos que las personas normales homocigotas sólo tienen un tipo de hemoglobina (A) y los afectados de anemia únicamente el tipo S, que se mueve más lentamente en el campo eléctrico. Los heterocigotos presentan ambos tipos, A y S. En otras palabras, hay codominancia a nivel molecular.

La anemia falciforme ilustra cómo los términos *dominancia*, *dominancia incompleta* y *codominancia* son en alguna medida arbitrarios. El tipo de dominancia que se infiere depende del nivel fenotípico en el que se realizan las observaciones, molecular, celular o de organismo completo. De hecho, la misma precaución se puede aplicar a muchas de las categorías en que los científicos suelen clasificar estructuras y procesos; estas categorías se crean por la conveniencia de facilitar el análisis.

El análisis poblacional de los alelos Hb^A y Hb^S se verá en el Capítulo 24.

COROLARIO

El tipo de dominancia está determinado por las funciones moleculares de los productos de los alelos de un gen y por el nivel al que se realizan las observaciones.

Las hojas del trébol muestran diversas situaciones en relación con el concepto de dominancia. Trébol es el nombre común que se le da a las plantas del género *Trifolium*. Hay muchas especies. Algunas de ellas son originarias de América del Norte y otras fueron introducidas desde otras zonas. Se han llevado a cabo muchos estudios genéticos con el trébol, que muestra una considerable variación entre individuos respecto al curioso dibujo en V de sus hojas. La Figura 4-7 muestra que estas diferentes manchas (o su ausencia) están determinadas por múltiples alelos. Aquí se trata de un polimorfismo genético, por lo que no se usan símbolos de silvestre y mutante. Estudiemos la figura y determinemos el tipo de dominancia de cada alelo en las diversas combinaciones. Hagamos una lista de los alelos de manera que se manifiesten sus relaciones de dominancia. ¿Existen incertidum-

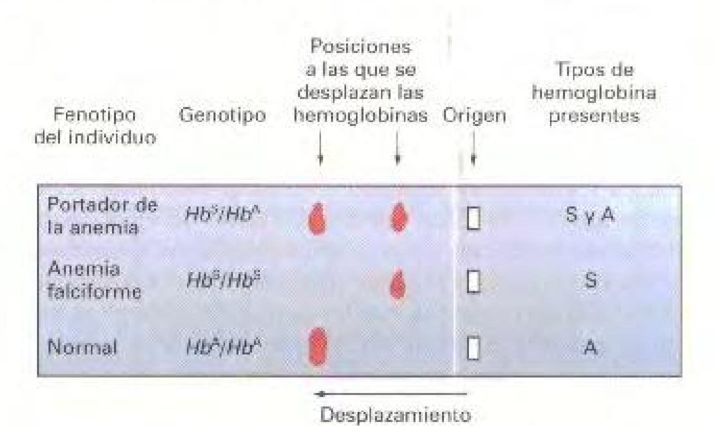


Figura 4-6. Electroforesis de las hemoglobinas de un individuo con anemia falciforme, de un heterocigoto (llamado *portador de la anemia falciforme*) y de un individuo normal. Las manchas marcan las posiciones a las que se han desplazado las hemoglobinas en el gel de almidón.

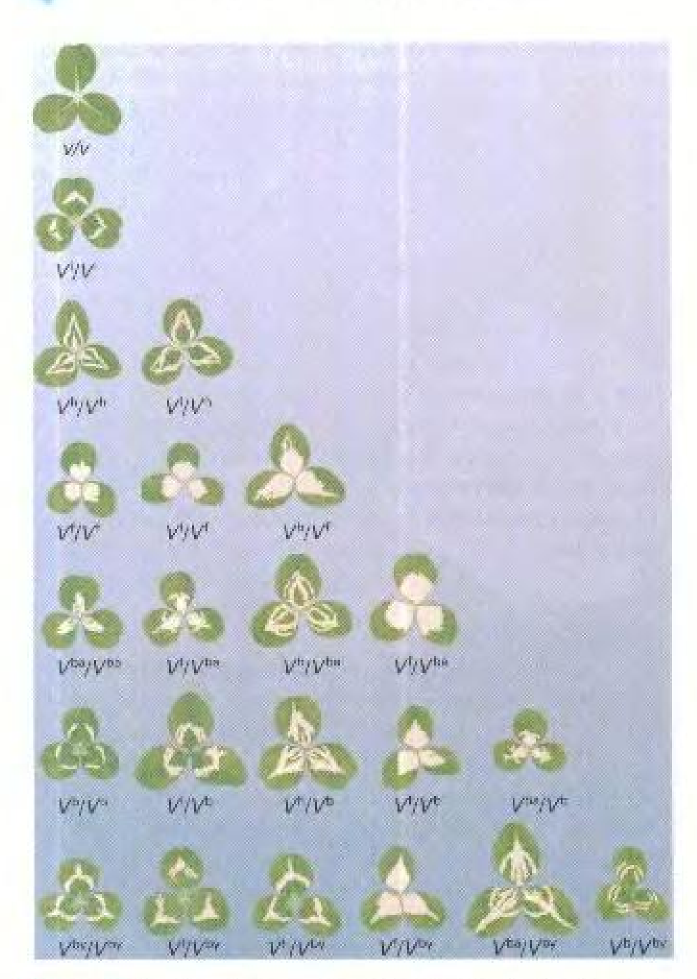


Figura 4-7. El patrón de manchas de las hojas del trébol está determinado por múltiples alelos. Debajo de cada planta se muestra su genotipo. (Adaptado de una foto de W. Ellis Davies).

bres? ¿Permiten los datos afirmar algo acerca de la dominancia o recesividad del alelo v?

Alelos letales

Los ratones normales silvestres presentan un color de pelaje bastante uniforme y de tono oscuro. Los mutantes llamados *yellow* (amarillo) presentan un pelaje más claro de color amarillo anaranjado e ilustran otra interacción alélica interesante. Al cruzar un ratón amarillo con un ratón silvestre, siempre se observa una relación 1:1 de ratones amarillos y normales. Esta observación sugiere que: (1) un único gen con dos alelos determina estas alternativas fenotípicas, (2) que el ratón amarillo era heterocigoto para estos alelos, y (3) que el alelo «amarillo» es dominante sobre el alelo que determina el color normal. Sin embargo, si dos ratones amarillos se cruzan, el resultado siempre es:

$$\text{amarillo} \times \text{amarillo} \rightarrow \tfrac{2}{3}\ \text{amarillo},\ \tfrac{1}{3}\ \text{silvestre}$$

Dos aspectos destacan en este resultado. Primero, la relación 2:1 es una desviación de los datos esperados de un autocruzamiento monohíbrido. Segundo, puesto que ningún cruce amarillo × amarillo produce una descendencia totalmente amarilla, como cabría esperar si cada parental fuera homocigoto, parece que es imposible obtener ratones homocigotos amarillos.

La explicación de estos resultados está relacionada con el hecho de que todos los ratones amarillos son heterocigotos para un alelo muy particular. Un cruzamiento entre dos heterocigotos debería dar lugar a la típica proporción genotípica monohíbrida 1:2:1. Sin embargo, si todos los ratones homocigotos de un tipo murieran antes de nacer, los nacidos vivos mostrarían una proporción de 2:1 de heterocigotos y homocigotos supervivientes. El alelo A^Y para el color amarillo es dominante sobre el alelo silvestre A con respecto a su efecto sobre el color del pelaje, pero A^Y actúa como un alelo letal recesivo con respecto a un carácter que podríamos llamar *viabilidad*. Así, un ratón con el genotipo homocigótico A^Y/A^Y muere antes de nacer y no se encontrará entre la descendencia. Todos los ratones amarillos supervivientes deben ser heterocigotos A^Y/A, por lo que un cruzamiento entre ratones amarillos siempre dará lugar a los siguientes resultados:

	$A^Y/A \times A^Y/A$	
Descendencia	$\tfrac{1}{4}\ A^Y/A^Y$	letal
	$\tfrac{1}{2}\ A^Y/A$	amarillo
	$\tfrac{1}{4}\ A/A$	silvestre

La proporción monohíbrida esperada, 1:2:1, aparece entre los cigotos pero se altera hasta una proporción de 2:1 debido a que los cigotos con un genotipo letal A^Y/A^Y no sobreviven. Esta hipótesis se confirma por el hecho de que cuando se extraen úteros de hembras gestantes de cruces amarillo × amarillo, un cuarto de los embriones están muertos. La Figura 4-8 muestra una típica camada de un cruzamiento entre ratones amarillos.

El alelo A^Y produce efectos sobre dos caracteres, el color del pelaje y la viabilidad del embrión: es pleiotrópico. Es completamente posible, sin embargo, que ambos efectos del alelo pleiotrópico A^Y sean debidos a la misma causa, que da lugar al fenotipo del pelaje en una dosis única y la muerte con dos dosis.

El fenotipo «falta de cola» de los gatos Manx (Fig. 4-9) también se debe a un alelo que es letal en homocigosis. Una dosis única del alelo Manx, M^L, interfiere de forma grave con el desarrollo de la espina dorsal, provocando la ausencia de cola en el heterocigoto M^L/M. Pero en los homocigotos M^L/M^L, la dosis doble del alelo provoca tal deformidad que el embrión no sobrevive.

Realmente existen alelos letales de muchos tipos distintos. Algunos alelos letales producen un fenotipo distinguible en heterocigosis, como en los ratones amarillos y los gatos Manx. Algunos alelos letales son completamente dominantes y causan la muerte con una sola dosis en heterocigosis. Otros (los más frecuentes) no confieren ningún fenotipo detectable en heterocigosis, y la letalidad es completamente recesiva. Además, los alelos letales difieren en la etapa del desarrollo en la que ejercen su efecto. Los alelos letales en nuestra especie ilustran muy bien este punto. Se estima que todos nosotros somos heterocigotos para un pequeño número de alelos letales recesivos en nuestros genomas. El efecto letal se expresa en la descendencia homocigótica de un emparejamiento entre dos personas que por casualidad son portadoras del mismo alelo letal recesivo en heterocigosis. Algunos alelos letales provocan la muerte en el útero, donde pasan desapercibidos o provocan abortos espontáneos. Otros



Figura 4-8. Camada de ratones de dos parentales heterocigotos para el alelo que determina color amarillo de pelaje, que es letal en homocigosis. Los ratones más grandes son los progenitores. No todos los descendientes son visibles. (Anthony Griffiths.)

alelos letales, como los responsables de la distrofia muscular de Duchenne, la fibrosis quística o la enfermedad de Tay-Sachs, ejercen su efecto en la infancia. El momento de la muerte puede tener lugar incluso durante la etapa adulta, como en la enfermedad de Huntington. El cómputo total de los alelos deletéreos que están presentes en los miembros individuales de una población se denomina *carga genética*, una especie de hipoteca que la población ha de soportar.

¿Qué es exactamente lo que no funciona en las mutaciones letales? En algunos casos, es posible rastrear la cascada de sucesos que conducen a la muerte. Una situación normal es cuando el alelo provoca la deficiencia de alguna reacción metabólica esencial. Las enfermedades humanas PKU y fibrosis quística constituyen buenos ejemplos de esta clase de deficiencia. En otros casos se produce un defecto estructural. Por ejemplo, un alelo letal de las ratas determina una proteína del cartílago anormal. Esta anomalía se expresa fenotípicamente en diversos órganos, dando lugar a síntomas que resultan letales, como muestra la Figura 4-10. La anemia falciforme, comentada anteriormente, es otro ejemplo.

En ocasiones, que un alelo sea letal o no depende del ambiente en el que se desarrolla el organismo. Mientras que ciertos alelos son letales en prácticamente cualquier entorno, otros son viables en unos ambientes y en otros son letales. Por ejemplo, la fibrosis quística es una enfermedad hereditaria que sería letal sin



Figura 4-9. Un gato Manx. Estos gatos son heterocigotos para un alelo dominante que impide el desarrollo de la cola. El alelo es letal en homocigosis. El distinto color de los ojos no está relacionado con la falta de cola (Gerard Lacz/NHPA.)

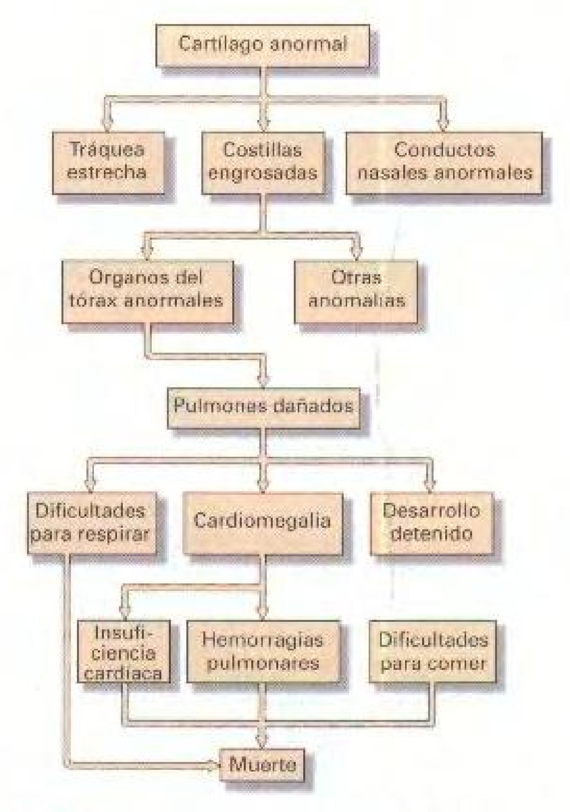


Figura 4-10. Esquema que muestra cómo un alelo letal concreto provoca la muerte en ratas. (De I. M. Lerner y W. J. libby, *Heredity, Evolution, and Society*, 2d ed. W. H. Freeman and Company, 1976; tomado de H. Grueneberg.)

tratamiento alguno. Es más, muchos de los alelos favorecidos por la selección llevada a cabo por los criadores de animales y plantas se verían eliminados en la naturaleza como resultado de la competición con miembros de la población natural. Las variedades modernas de grano proporcionan un buen ejemplo: sólo un cuidadoso tratamiento de los granjeros ha mantenido tales alelos para nuestro provecho.

Los genetistas se encuentran a menudo con situaciones en las que las proporciones fenotípicas esperadas se desvían siempre en la misma dirección, debido a la reducción de viabilidad que causa un alelo determinado. Por ejemplo, entre los descendientes del cruzamiento $A/a \times a/a$, esperaríamos una proporción del 50 % de individuos A/a y otro 50 % de individuos a/a, pero podríamos observar de manera consistente proporciones del 55 %: 45 ó 60 % y 40 %. En tales casos, se dice que el fenotipo recesivo es *subvital* o *semiletal*, ya que la letalidad se expresa sólo en algunos individuos. Así, la letalidad puede oscilar desde el 0 al 100 %, dependiendo del propio gen, del resto del genoma y del medio ambiente.

COROLARIO

Un gen puede presentarse en diferentes formas o estados, que reciben el nombre de alelos múltiples. Se dice de estos alelos que constituyen una serie alélica, y los miembros de una misma serie pueden mostrar diversos grados de dominancia entre sí.

Las interacciones génicas pueden provocar proporciones dihíbridas modificadas

Por medio del análisis genético se pueden identificar los genes que interaccionan en la determinación de una propiedad biológica concreta. La prueba clave para determinar que dos genes interaccionan es que den lugar a *proporciones dihíbridas modificadas*. Existen varios tipos de interacciones que provocan una serie de modificaciones diferentes. Es importante distinguir entre genes que interaccionan en distintas rutas biológicas y aquéllos que lo hacen en la misma ruta biológica.

Genes que interactúan en rutas distintas

Un ejemplo simple, aunque sorprendente, de interacción génica es la herencia del color de la piel de la serpiente del maíz. Como se muestra en la Figura 4-11*a*, el color natural consiste en un patrón repetitivo de manchas negras y naranjas que le sirven de camuflaje. El fenotipo está producido por dos pigmentos distintos, los dos bajo control genético. Un gen determina el color naranja, y de él consideraremos los alelos o^+ (presencia de pigmento naranja) y o (ausencia de pigmento naranja). Otro gen determina la presencia o no de pigmento negro, con los alelos b^+ (presencia de pigmento negro) y b (ausencia del mismo). Estos dos genes no están ligados. El patrón normal está producido por el genotipo $o^+/-$; $b^+/-$. Una serpiente con el genotipo o/o ; $b^+/-$ es negra ya que carece del pigmento naranja (Fig. 4-11*b*), y una serpiente o^+/o ; b/b es naranja por carecer de pigmento negro (Figura 4-11*c*). El doble homocigoto recesivo o/o; b/b es albino, como se muestra en la Figura 4-11*d*. Observe, sin embargo, el leve color rosado del albino, que es consecuencia de la presencia de otro pigmento, la hemoglobina de la sangre, visible a través de la piel de la serpiente cuando los otros pigmentos están ausentes. El ejemplar albino también nos indica claramente que existe otro elemento que interviene en el patrón de pigmentación de la piel de la serpiente, además de los pigmentos, y este elemento es el motivo repetitivo dentro y alrededor del cual se deposita el pigmento.

Como intervienen dos genes en este sistema, obtenemos el típico patrón de herencia dihíbrida, donde los cuatro fenotipos posibles aparecen en proporciones 9:3:3:1 en la F_2. Un análisis típico sería:

hembra o^+/o^+ ; b/b (naranja) × macho o/o ; b^+/b^+ (negro)

↓

F_1 o^+/o ; b^+/b (camuflado)

hembra o^+/o ; b^+/b (camuflado)
× macho o^+/o ; b^+/b (camuflado)

↓

F_2 9 $o^+/-$; $b^+/-$ (camuflado)
3 $o^+/-$; b/b (naranja)
3 o/o ; $b^+/-$ (negro)
1 o/o ; b/b (albino)

En resumen, la proporción dihíbrida 9:3:3:1 se produce porque las mutaciones afectan a dos rutas bioquímicas paralelas:

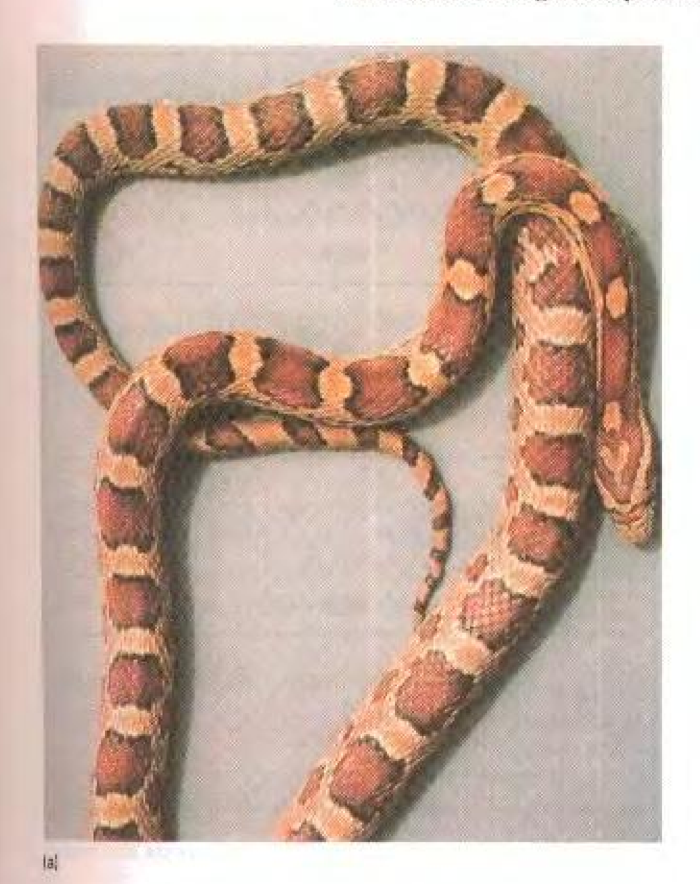
$$\left.\begin{array}{l}\text{precursores} \xrightarrow{b^+} \text{pigmento negro} \\ \text{precursores} \xrightarrow[o^+]{} \text{pigmento naranja}\end{array}\right\} \text{(camuflado)}$$

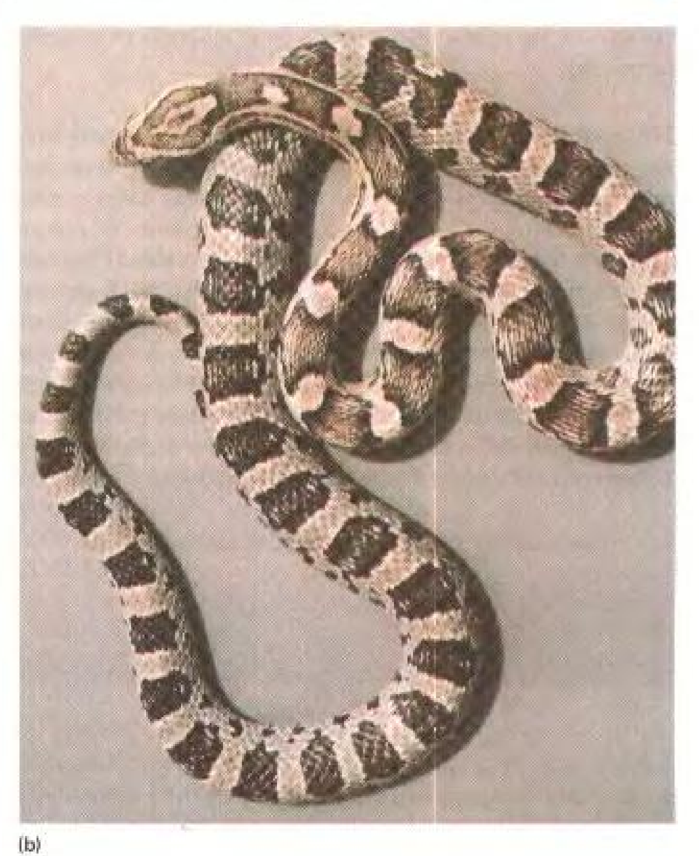
Normalmente, los genes que interactúan a través de dos rutas diferentes producen una F_2 con cuatro fenotipos diferentes, que se corresponden con las cuatro clases genotípicas posibles, como en el ejemplo de las serpientes. Sin embargo, cuando las mutaciones se producen en la misma ruta biológica, se observan proporciones fenotípicas distintas. Generalmente, sólo se producen dos o tres clases fenotípicas a partir de diversas combinaciones de las clases genotípicas. Del mismo modo, las proporciones de la F_2 aparecen como modificaciones de la proporción 9:3:3:1 como consecuencia del agrupamiento de varios componentes de dicha proporción. A continuación se tratarán diversos ejemplos.

Genes que interactúan en la misma ruta

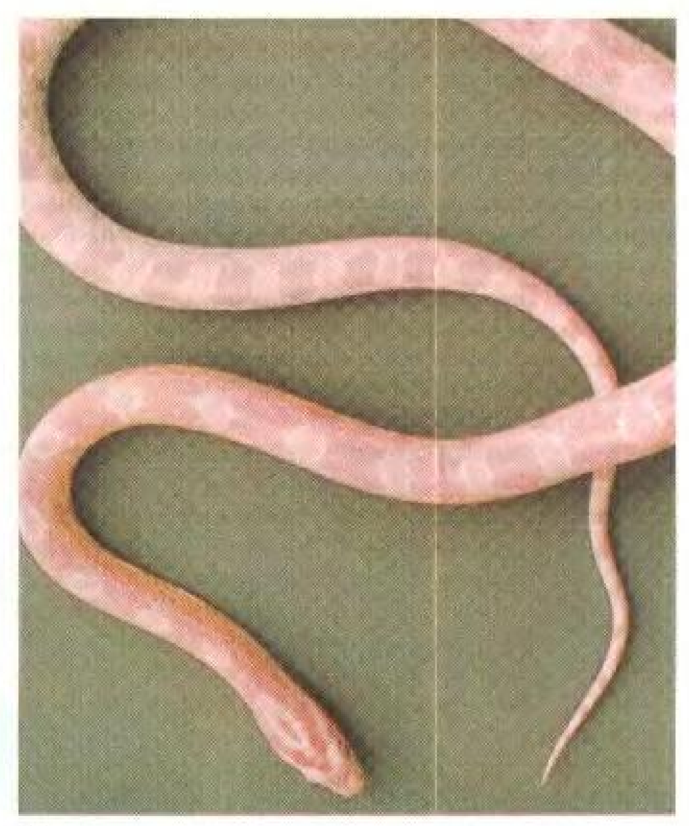
Para obtener un ejemplo de proporciones modificadas por genes que interactúan en la misma ruta, sólo hay que regresar

Figura 4-11. Análisis de los genes que controlan la pigmentación de la piel de la serpiente del maíz. El silvestre (a) presenta un patrón de pigmentación de la piel formado por dos pigmentos, uno negro y otro naranja. El gen *O* determina una enzima de la ruta biosintética del pigmento naranja: cuando esta enzima es defectuosa (*o/o*) no se produce pigmento naranja y la serpiente es negra (b). El otro gen, *B*, determina otra enzima para producir el pigmento negro: cuando esta enzima es defectuosa (*b/b*), la serpiente es naranja (c). Cuando las dos enzimas son defectuosas, la serpiente es albina (d). Así, los cuatro genotipos homocigotos serían : (a) *O/O* ; *B/B*, (b) *o/o* ; *B/B*, (c) *o/o* ; *b/b*, (d) *o/o* ; *b/b*. Un cruzamiento (a) × (d) ó (b) × (c) daría lugar a una F_1 silvestre dihíbrida y unas proporciones 9:3:3:1 de los cuatro fenotipos en la F_2 (Anthony Griffiths).


(a)


(b)


(c)


(d)

ejemplo de las campanillas, tratado en el apartado de complementación.

Mutaciones con el mismo fenotipo. La ruta de las antocianinas en las campanillas finalizaba con la producción de un pigmento azul, mientras que los intermediarios eran todos incoloros. Se cruzaron dos líneas homocigóticas diferentes de pétalos blancos y toda la F_1 presentó flores azules, indicando complementación. ¿Qué se esperaría de la F_2 resultante de cruzar esas plantas F_1? En la F_2 aparecen plantas tanto de pétalos azules como blancos, en una proporción 9:7. ¿Cómo se explica este resultado? La proporción 9:7 es claramente una modificación de la proporción dihíbrida 9:3:3:1, donde las clases 3:3:1 se han agrupado para dar 7. El cruzamiento de las dos líneas blancas y las generaciones subsiguientes pueden representarse así:

(blanca) $w1/w1$; $w2^+/w2^+$ × (blanca) $w1^+/w1^+$; $w2/w2$

↓

F_1 $w1^+/w1$; $w2^+/w2$ (azul)

$w1^+/w1$; $w2^+/w2$ × $w1^+/w1$; $w2^+/w2$

↓

F_2

9 $w1^+/-$; $w2^+/-$	(azul)	9
3 $w1^+/-$; $w2/w2$	(blanca)	7
3 $w1/w1$; $w2^+/-$	(blanca)	
1 $w1/w1$; $w2/w2$	(blanca)	

Los resultados muestran que la homocigosis del alelo mutante en *cualquiera* de los genes, o en *ambos* a la vez, causa que la planta tenga pétalos blancos. Para poseer un fenotipo azul, la planta debe tener al menos un alelo dominante en cada gen.

Un tipo importante de interacción génica a nivel molecular, es la interacción entre un gen regulador y el gen al que regula (Fig. 4-12). Tales genes también muestran un tipo de complementación. Una situación corriente es aquella en la que un gen regulador produce una proteína reguladora que se une a un lugar de control en la región 5' del gen regulado, posiblemente para facilitar la acción de la polimerasa de RNA (Fig. 4-12*a*). En ausencia de la proteína reguladora, el gen regulado apenas se transcribe con niveles muy bajos, inadecuados para las necesidades celulares. Este tipo de interacción génica se puede estudiar en una situación en la cual un organismo dihíbrido es heterocigoto respecto a una mutación nula del gen regulador (r^+/r) y heterocigoto respecto a una mutación nula (a^+/a) en el gen regulado, cuyo producto se necesita para desempeñar una determinada reacción enzimática. Supongamos que esta última mutación es una mutación sin sentido que provoca un fin prematuro de la traducción. Normalmente, los codones de parada o fin de mensaje se encuentran en el extremo 3' de cada mRNA, pero la mutación puede introducir un codón de parada dentro de la secuencia estructural. En esta posición, se genera una versión acortada del polipéptido. Supongamos que la mutación se halla cerca del extremo 5' de la región que determina la proteína. Los genotipos posibles se muestran en la Figura 4-12. El codón de parada conduciría a una terminación prematura de la traducción que generaría un polipéptido excesivamente pequeño, incapaz de desempeñar la función silvestre. El dihíbrido r^+/r ; a^+/a produciría la siguiente descendencia:

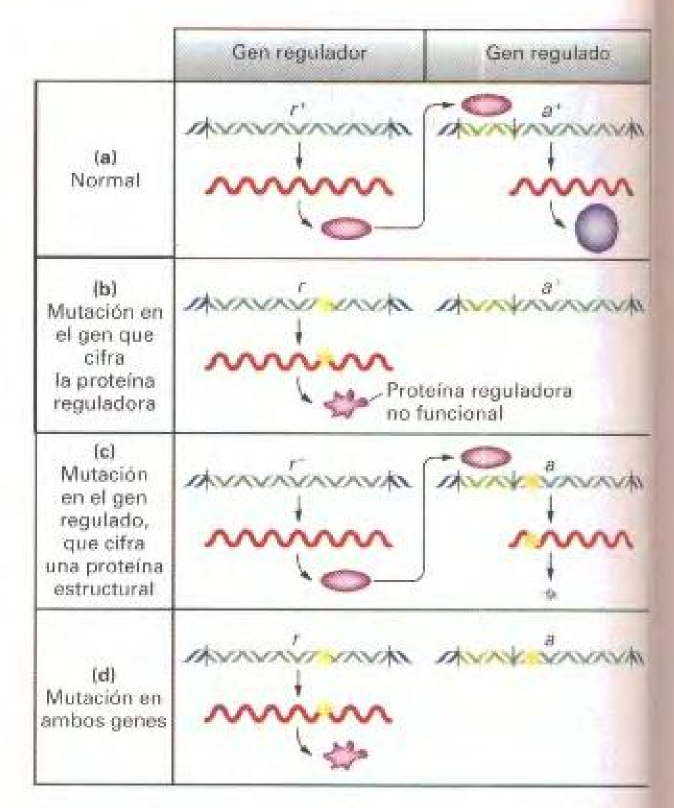


Figura 4-12. Interacción entre un gen regulador y un gen diana regula por aquél.

Proporción genotípica	Genotipo	Proteína a^+ funcional	Proporción fenotípica
$\frac{9}{16}$	$r^+/-$; $a^+/-$	sí	9
$\frac{3}{16}$	$r^+/-$; a/a	no	7
$\frac{3}{16}$	r/r ; a^+/a	no	
$\frac{1}{16}$	r/r ; a/a	no	

Hemos visto, pues, un nuevo tipo de complementación deriva de la interacción cooperativa entre un gen regulador y un g regulado.

Mutaciones con fenotipos diferentes. Si uno o más produc intermediarios de una ruta bioquímica presentan coloración, e tonces se producen unas proporciones diferentes en la F_2. En ejemplo siguiente, tomado de la planta «Mary ojos azules» (C *llinsia parviflora*), la ruta es:

$$\text{incoloro} \xrightarrow{\text{gen } w^+} \text{magenta} \xrightarrow{\text{gen } m^+} \text{azul}$$

Los genes w y m no están ligados. Si se cruzan plantas hom cigóticas blancas y magenta, la F_1 y la F_2 serán:

w/w ; m^+/m^+ (blanca) × w^+/w^+ ; m/m (magenta)

↓

F_1 w^+/w ; m^+/m (azul)

w^+/w ; m^+/m × w^+/w ; m^+/m

↓

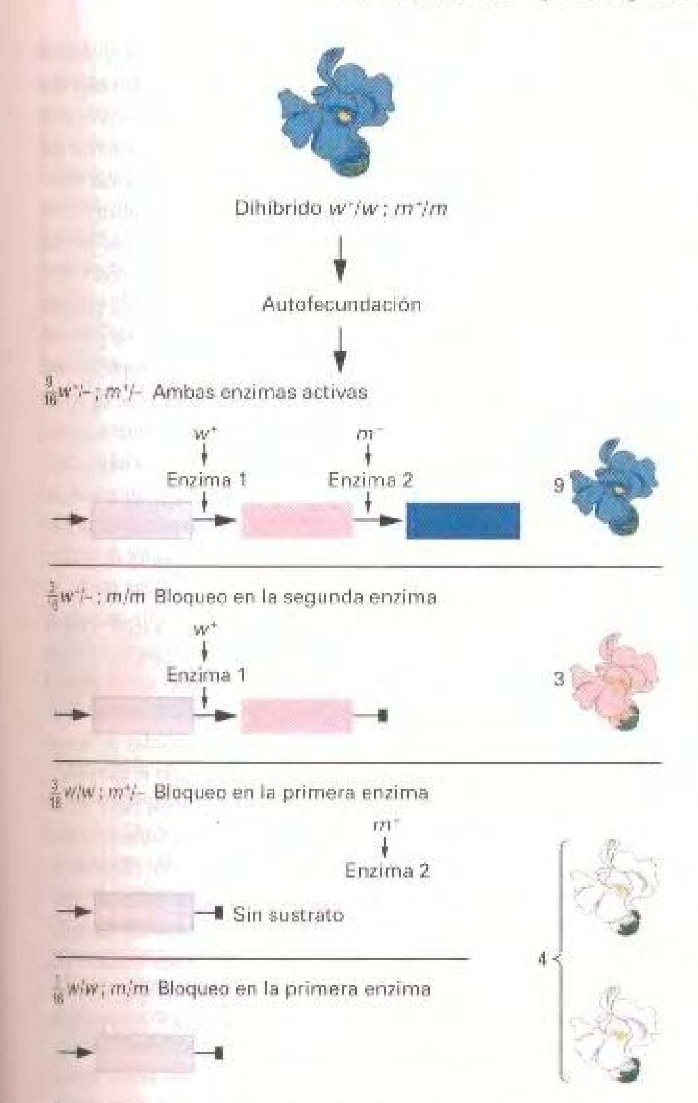
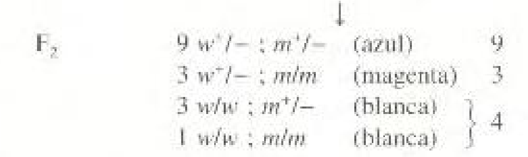


Figura 4-13. Mecanismo molecular de la epistasia recesiva. Dos genes realizan pasos sucesivos en la ruta biosintética que conduce a la producción de un pigmento azul que se deposita en los pétalos. Los sustratos de estas enzimas son incoloro y rosa, respectivamente, por lo que los alelos nulos de estos genes determinan pétalos incoloros (blancos) o rosas. La epistasia se pone de manifiesto en el doble mutante, ya que éste muestra el fenotipo recesivo correspondiente al gen que actúa en primer lugar en la ruta (es decir, blanco). Por consiguiente, la mutación en el gen que actúa primero evita la expresión de cualquier alelo del gen que actúa a continuación.



	↓			
F_2	9 $w^+/-$; $m^+/-$	(azul)	9	
	3 $w^+/-$; m/m	(magenta)	3	
	3 w/w ; $m^+/-$	(blanca)	4	
	1 w/w ; m/m	(blanca)		

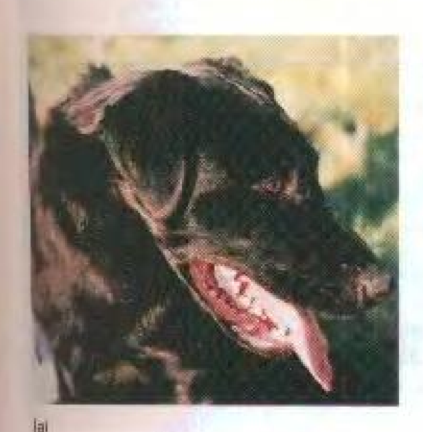
Se observa una proporción fenotípica 9:3:4. Esta clase de interacción se llama **epistasia** que, literalmente, significa «predominante sobre». Dicho de otra forma, un alelo de un gen enmascara la expresión de los alelos de otro gen. En este ejemplo, el alelo w es epistático sobre los alelos m^+ y m, y estos últimos alelos sólo pueden expresarse en presencia de w^+. Puesto que el alelo epistático es recesivo, este caso se denomina **epistasia recesiva**. La Figura 4-13 ilustra el estado de la ruta de biosíntesis en distintos genotipos.

COROLARIO

Se infiere un caso de epistasia cuando un alelo de un gen enmascara la expresión de los alelos de otro gen y expresa en su lugar su propio fenotipo.

En general, cada vez que el producto de un gen actúa en una posición anterior en alguna ruta bioquímica, deberíamos esperar que un alelo suyo defectuoso tuviera un efecto epistático sobre los alelos de los genes que actúan posteriormente en la ruta. Así, el descubrimiento de un caso de epistasia (p. ej., la proporción dihíbrida desviada 9:4:3) puede revelar datos acerca del orden en que actúan los genes. Este principio es de gran utilidad para ordenar los distintos pasos de las rutas bioquímicas.

Otro caso de epistasia recesiva bien conocido por la mayoría de nosotros es el color dorado del pelaje de los perros de raza Labrador. Dos alelos, B y b, producen pelaje negro y marrón.



(a)



(b)



(c)

Figura 4-14. Herencia del color del pelaje en los perros de la raza Labrador. Dos alelos (B y b) de un gen que controla el color del pigmento determinan (a) color negro y (b) color marrón, respectivamente. Un gen diferente, E, permite el depósito del pigmento en la cubierta del pelo y e/e impide dicho depósito, dando lugar al fenotipo dorado (c). Éste es un caso de epistasia recesiva. Así, los tres genotipos homocigóticos son: (a) B/B ; E/E, (b) b/b ; E/E, (c) B/B ; e/e ó b/b ; e/e. Muy probablemente, el perro mostrado en (c) es B/B ; e/e, porque parece tener capacidad de formar pigmento negro, como se observa por el color negro de la nariz y los labios, aunque no lo deposita en los pelos. La descendencia de un cruzamiento dihíbrido produciría una proporción 9:3:4 de negro: marrón: dorado. (Anthony Griffiths.)

respectivamente, pero el alelo e de otro gen es epistático sobre ellos, generando un pelaje de color dorado (Fig. 4-14). Así, ambos genotipos $B/-$; e/e y b/b; e/e provocan fenotipo dorado, mientras que $B/-$; $E/-$ y b/b ; $E/-$ dan lugar, respectivamente, a fenotipos negro y marrón. Este caso de epistasia no está ocasionado por un bloqueo en un paso anterior de una ruta que conduce a un pigmento que causa color oscuro. Los perros dorados pueden producir pigmento negro y marrón, como se aprecia en su nariz y boca. Lo que hace el alelo e es impedir que el pigmento se deposite en los pelos. En este caso, el gen epistático se encuentra en un *punto de actuación posterior en el desarrollo*; es un requisito del desarrollo que se encuentre en estado E para que pueda depositarse el pigmento.

COROLARIO

La epistasia es indicativa de genes que interaccionan en alguna ruta bioquímica o de desarrollo.

Supresores. Otro tipo importante de interacción génica es la **supresión**. Un supresor es un alelo que elimina el efecto de una mutación ocurrida en otro gen, dando lugar a un fenotipo normal (silvestre). Por ejemplo, supongamos que el alelo a^+ provoca el fenotipo normal, mientras que el alelo mutante recesivo a genera cierta anormalidad. Un alelo mutante recesivo s de otro gen suprime el efecto de a, de modo que al genotipo a/a ; s/s le corresponderá el fenotipo silvestre (tipo a^+). A menudo, los alelos supresores no ejercen ningún efecto sobre los alelos silvestres del gen diana, de manera que en este ejemplo, el fenotipo a^+/a^+ ; s/s sería silvestre.

Los supresores también dan lugar a proporciones dihíbridas alteradas. Veamos un ejemplo real en *Drosophila*, utilizando el alelo recesivo *su*, supresor del alelo no ligado *pd*, que da lugar a un color morado de los ojos. Se cruza una mosca homocigótica de ojos morados con otra homocigótica de ojos rojos portadora del alelo supresor:

pd/pd ; su^+/su^+ (morado) × pd^+/pd^+ ; su/su (rojo)

↓

F_1 Todos pd^+/pd ; su^+/su (rojo)

pd^+/pd ; su^+/su (rojo) × pd^+/pd ; su^+/su (rojo)

↓

F_2	9 $pd^+/-$; $su^+/-$	(rojo)	13
	3 $pd^+/-$; su/su	(rojo)	
	1 pd/pd ; su/su	(rojo)	
	3 pd/pd ; $su^+/-$	(morado)	3

La proporción de la F_2 es 13 de color rojo: 3 de color morado. Esta proporción es típica de un supresor recesivo que actúa sobre una mutación recesiva. Existen supresores tanto recesivos como dominantes, y pueden actuar sobre mutaciones recesivas o dominantes. Estas posibilidades originan una gran variedad de proporciones fenotípicas distintas.

La supresión se confunde a menudo con la epistasia. Sin embargo, la diferencia fundamental estriba en que un supresor anula la expresión de un alelo mutante y restablece el correspondiente fenotipo silvestre. Por lo tanto, la proporción dihíbrida modificada sólo puede presentar dos fenotipos (normal y anormal) mientras que en el caso de la epistasia, el alelo epistático introduce un tercer fenotipo en la proporción.

¿Cómo actúan los supresores a nivel molecular? Hay much mecanismos posibles. Un tipo bien estudiado es el de los **supre res sin sentido**, que actúan sobre mutaciones causadas por cod nes de fin de mensaje (sin sentido) en medio de una secuencia q determina una proteína. Los mutantes sin sentido muestran term nación prematura de la cadena de aminoácidos. Sin embargo, u mutación en el anticodón de un tRNA que permita a éste inser un aminoácido en el codón sin sentido suprimirá el efecto de mutación, permitiendo que la síntesis proteica avance, pasan por el sitio de la mutación en el mRNA. Puesto que los genes tRNA suelen estar repetidos en varias copias, este supresor s perfectamente viable. Otro tipo de supresión posible se da en l interacciones proteína-proteína. Si dos proteínas interaccion (encajan la una en la otra) para realizar una función celular, cu do una mutación causa un cambio de conformación en una de proteínas, no se produce la unión y por lo tanto tampoco la fu ción (Fig. 4-15). Sin embargo, un cambio compensador de conf mación debido a una mutación en la segunda proteína puede tuar como supresor, restaurando una interacción que permita complejo desarrollar su función. Finalmente, en situaciones en cuales una mutación causa un bloqueo en una ruta metabólica, supresor puede de algún modo evitar el bloqueo, por ejemp utilizando sustancias de otras rutas e introduciéndolas en la r en un punto posterior a donde se está produciendo el bloqueo

Precisamente porque se produce una interacción entre un presor y su gen diana, los genetistas buscan supresores de for deliberada, como otro medio de buscar genes implicados en determinado proceso o estructura. La aproximación experime tal es relativamente sencilla: se realiza un experimento de mu génesis a gran escala comenzando con una línea mutante genotipo m) y simplemente se buscan individuos que sean vestres. La mayoría de éstos serán revertientes m^+, pero algun

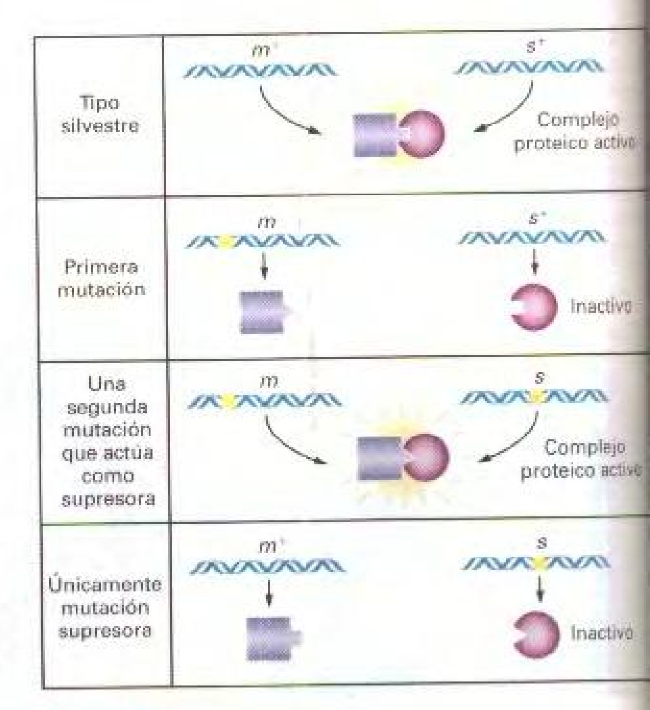


Figura 4-15. Un mecanismo molecular de supresión.

serán supresores ($m \cdot su$) y éstos pueden distinguirse por las proporciones dihíbridas que producirán en los cruzamientos. Este procedimiento es fácil de llevar a cabo en organismos haploides. Por ejemplo, si se extiende un gran número de células de un mutante que requiere arginina (*arg*) sobre una placa de Petri con un medio que carezca de arginina, la mayoría de las células no crecerán; sin embargo, los mutantes por reversión (arg^+) y los supresores ($arg \cdot su$) sí crecerán y mostrarán su presencia formando colonias visibles. Las colonias con mutaciones supresoras pueden distinguirse cruzándolas con la estirpe silvestre, ya que deben aparecer descendientes que requieran arginina:

$$arg \cdot su \quad \times \quad arg^+ \cdot su^+$$
$$\downarrow$$
$$\left.\begin{array}{l} arg^+ \cdot su^+ \\ arg^+ \cdot su \\ arg \cdot su^+ \end{array}\right\} \text{no requieren arginina}$$
$$arg \cdot su^+ \quad \text{requiere arginina}$$

COROLARIO

Los supresores cancelan la expresión de un alelo mutante de otro gen, dando lugar a un fenotipo normal silvestre.

Genes duplicados. Nuestro último ejemplo de interacción génica en la misma ruta se basa en la idea de que algunos genes pueden estar presentes más de una vez en el genoma. El ejemplo siguiente se relaciona con los genes que controlan la forma del fruto en la planta crucífera denominada bolsa de pastor, *Capsella bursa-pastoris*. Dos líneas de plantas diferentes presentan frutos con morfologías completamente distintas: una es «acorazonada» y la otra «estrecha». ¿Están estos fenotipos determinados por dos alelos del mismo gen? Un cruzamiento entre las dos líneas produce una F_1 con frutos de forma acorazonada. Este resultado es coherente con la hipótesis de la determinación por un par de alelos de un gen único. Sin embargo, los resultados de la F_2 arrojan una proporción de 15:1 entre acorazonados y estrechos respectivamente. Este cociente sugiere una modificación específica de las proporciones mendelianas dihíbridas 9:3:3:1 en las que se agrupen 9, 3 y 3. El control genético de la forma del fruto se puede explicar en términos de genes duplicados (Fig. 4-16). Aparentemente, los frutos con forma de corazón surgen cuando hay al menos un alelo dominante en cualquiera de los dos genes. Ambos genes parecen tener idéntica función. Merece la pena comparar esta situación de 15:1, con la proporción 9:7 donde se requiere al menos un alelo dominante en ambos genes para producir un determinado fenotipo.

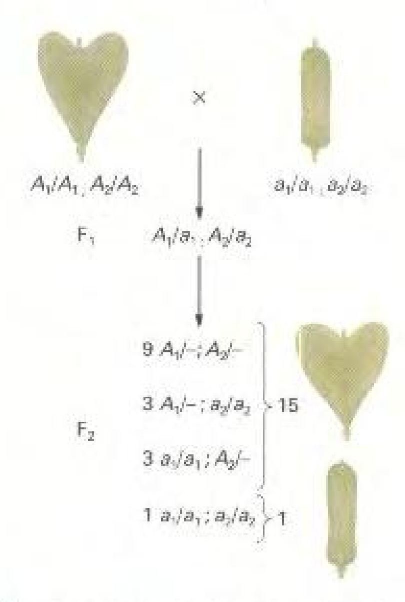


Figura 4-16. Patrón de herencia de los genes duplicados que controlan la morfología del fruto en la planta bolsa de pastor. Tanto A_1 como A_2 pueden producir frutos redondeados.

COROLARIO

Los genes duplicados proporcionan alternativas genéticas para la producción de un fenotipo concreto.

A continuación, trataremos dos casos (uno vegetal y otro animal) que ilustran cómo interactúan más de dos genes para determinar ciertas características específicas de un organismo.

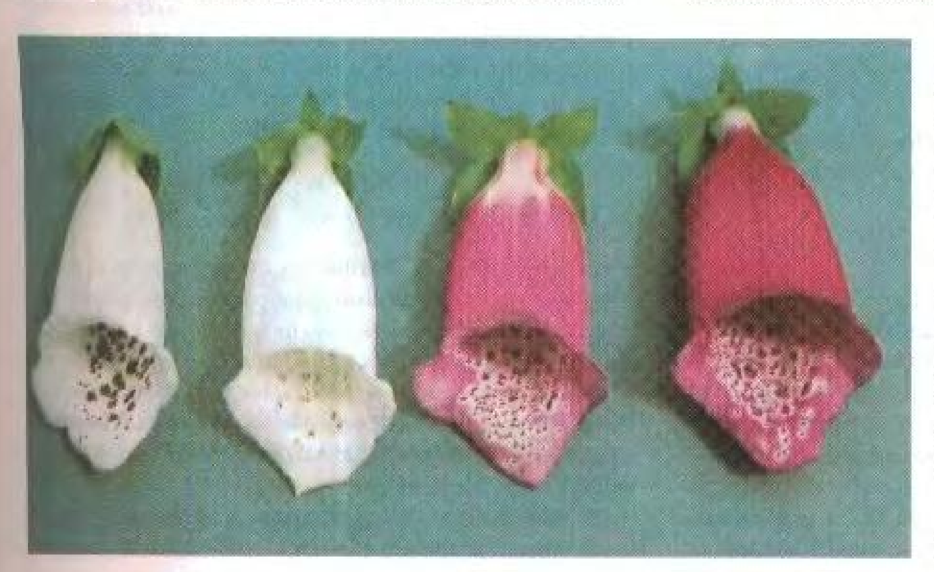


Figura 4-17. Fenotipos de coloración de la dedalera, determinados por tres genes distintos. *M* cifra una enzima que sintetiza una antocianina, el pigmento violeta que se ve en estos pétalos; *m*/*m* no sintetiza el pigmento y produce el fenotipo albino con manchas amarillas. *D* es un intensificador de la producción de antocianina, dando lugar a una coloración más intensa; *d*/*d* no produce esa intensificación. En el tercer locus, *w*/*w* permite el depósito del pigmento en los pétalos, pero *W* impide este depósito, excepto en las manchas, dando lugar así al fenotipo blanco con manchas. Los genotipos (y fenotipos) de la fotografía son, de izquierda a derecha: *M*/– ; *W*/– ; –/– (blanco con manchas violeta), *m*/*m* ; –/– ; –/– (blanco con manchas amarillentas), *M*/– ; *w*/*w* ; *d*/*d* (violeta claro), *M*/– ; *w*/*w* ; *D*/– (violeta oscuro). (Anthony Griffiths.)

Interacciones génicas en el color de los pétalos de la dedalera

Las variantes genéticas de la planta dedalera (*Digitalis purpurea*) ofrecen ejemplos excelentes de determinación génica del aspecto general de un organismo. Hay tres genes fundamentales en la determinación de la coloración de los pétalos. El primer gen determina la capacidad de la planta para sintetizar un pigmento de color violeta (un tipo particular de antocianina). El alelo *M* de este gen posibilita la síntesis de la antocianina, mientras que el alelo *m* provoca incapacidad para fabricarla, dando lugar a pétalos blancos. La Figura 4-17 muestra los fenotipos a los que nos referiremos en esta exposición. El segundo gen es un gen modificador. Uno de sus alelos, *D*, determina la síntesis de grandes cantidades de antocianina (fenotipo violeta oscuro), mientras que el alelo *d* causa una baja producción del pigmento (fenotipo violeta claro). Posiblemente, los alelos *D* y *d* regulan la síntesis del pigmento por parte de *M*. El tercer gen controla la distribución. El alelo *W* impide la deposición del pigmento en todas las partes del pétalo excepto en las manchas interiores, en tanto que el alelo *w* permite la deposición del pigmento en todo el pétalo. Así, estos tres genes controlan la posibilidad de sintetizar el pigmento, la cantidad a sintetizar y la capacidad de depositarlo en células específicas del pétalo. Consideraremos varios cruzamientos dihíbridos e incluso un cruzamiento trihíbrido.

Consideremos el cruzamiento entre los genotipos *M/M ; D/D ; w/w* y *M/M ; d/d ; W/W*. El fenotipo del primer genotipo será violeta oscuro ya que posee el alelo modificador *D* y la capacidad de depositar el pigmento en todas las células. El segundo fenotipo será blanco con manchas violeta porque, aunque la planta tiene la capacidad de sintetizar el pigmento (que le confiere el alelo *M*), el alelo *W* impide la deposición del mismo, excepto en las manchas del interior de la flor. Realicemos el pedigrí habitual pero eliminando el alelo *M*, ya que todos los individuos serán homocigóticos para el mismo:

(*M/M*) *D/D ; w/w* (violeta oscuro)	×	(*M/M*) *d/d ; W/W* (blanco con manchas violeta)
	↓	

F_1 *D/d ; W/w* (blanco con manchas violeta)

D/d ; W/w (blanco con manchas violeta)	×	*D/d ; W/w* (blanco con manchas violeta)
	↓	

F_2	9 *D/– ; W/–*	(blanco con manchas violeta)	12
	3 *d/d ; W/–*	(blanco con manchas violeta)	
	3 *D/– ; w/w*	(violeta oscuro)	3
	1 *d/d ; w/w*	(violeta claro)	1

En total, se produce una proporción fenotípica 12:3:1. Este tipo de interacción recibe el nombre de **epistasia dominante** debido a que, como se observa en los resultados de la F_2, el alelo dominante *W* suprime la expresión de las dos alternativas representadas por los alelos *D* y *d*, violeta oscuro y violeta claro, y las reemplaza por otro fenotipo, blanco con manchas violeta.

Los otros dos dihíbridos, en los cuales el tercer gen es homocigótico, generarán proporciones fenotípicas 9:3:4, propias de la epistasia recesiva, porque en ambos casos aparece el alelo *m*, que elimina cualquier producción de pigmento. Por ejemplo, el cruzamiento entre individuos dihíbridos *M/m ; D/d ; w/w* origina las siguientes proporciones en su descendencia:

M/– ; D/d	(violeta oscuro)	9
M/– ; d/d	(violeta claro)	3
m/m ; D/–	(blanco)	4
m/m ; d/d	(blanco)	

Un trihíbrido del tipo *M/m ;W/w; D/d* produciría la siguiente descendencia:



Con una proporción de:

36/64 *blanco con manchas violeta*	36
9/64 *violeta oscuro*	9
3/64 *violeta claro*	3
16/64 *blanco*	16

Interacción génica en el color del pelaje de los mamíferos

El análisis del color del pelaje de los mamíferos es un ejemplo admirable de cómo genes diferentes cooperan entre sí para determinar el aspecto general del pelaje. El ratón es un buen sistema para realizar estudios sobre mamíferos, porque es pequeño y, por tanto, resulta fácil de mantener en el laboratorio, y porque su ciclo reproductor es muy corto. Es el mamífero mejor estudiado en relación con la determinación genética del color del pelaje. Esta determinación del color del pelaje es muy similar en otros mamíferos y debido a esta razón, el ratón se considera como un sistema modelo. Conforme avancemos en nuestra presentación, veremos algunos ejemplos de otros mamíferos. Al menos cinco genes cooperan entre sí para determinar el color del pelaje de los ratones: *A*, *B*, *C*, *D* y

El gen *A*

Este gen controla la distribución del pigmento en el pelo. El alelo silvestre *A* produce un fenotipo denominado *agutí*. Agutí es un tono grisáceo, con aspecto moteado, o «sal y pimienta». Es un color frecuente en los mamíferos. El aspecto se debe a la presencia de una banda amarilla sobre el fondo oscuro de la cubierta del pelo. La banda amarilla no aparece en el fenotipo no agutí (determinado por el alelo *a*) de modo que el color adquiere un color más oscuro y uniforme (Fig. 4-18).

El alelo letal A^Y, discutido en un apartado anterior, es un alelo de este gen; hace que la cubierta entera del pelo sea

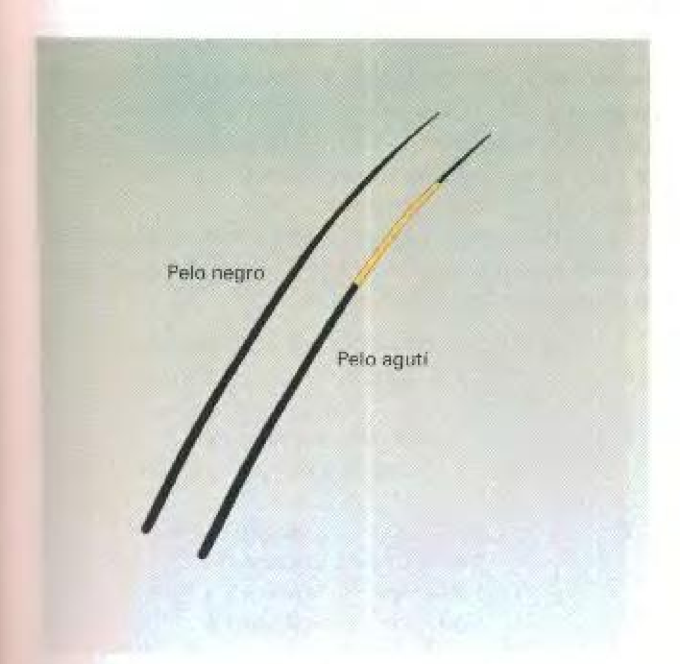


Figura 4-18. Pelos de un ratón agutí y uno negro. La banda amarilla de cada pelo da a la forma agutí su aspecto moteado.

color amarillo. Otro alelo más es a^t, que produce un fenotipo negro y moreno, vientre amarillo y resto del cuerpo de color oscuro. Para simplificar, estos dos últimos alelos no se incluirán en la discusión siguiente.

El gen *B*

Este gen determina el color del pigmento. Los dos alelos principales son *B*, que da lugar a pigmento negro, y *b*, que da lugar a pigmento marrón. El alelo *B*, en combinación con *A*, produce el color normal agutí, pero produce un color oscuro continuo en combinación con *a/a*. El genotipo *A/– ; b/b* produce un color marrón claro, llamado *canela*, y el genotipo *a/a ; b/b* produce un color marrón más denso.

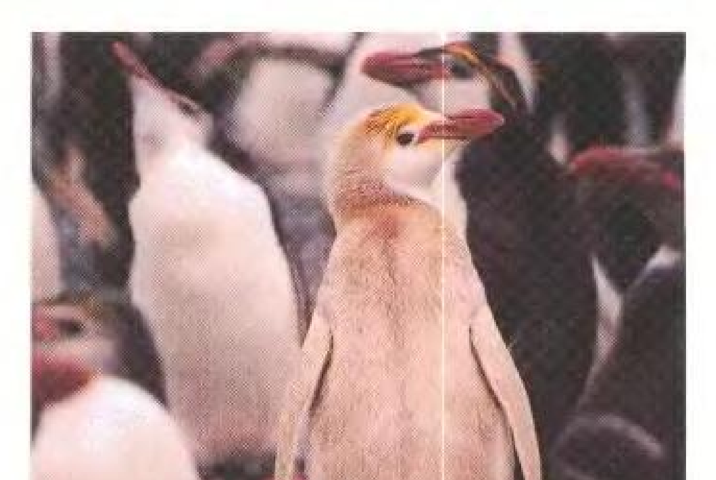
El siguiente cruzamiento ilustra el patrón de herencia de los genes *A* y *B*:

A/A ; b/b (canela) × *a/a ; B/B* (negro)
o *A/A ; B/B* (agutí) × *a/a ; b/b* (marrón)
↓
F_1 todos *A/a ; B/b* (agutí)
A/a ; B/b (agutí) × *A/a ; B/b* (agutí)
↓
F_2 9 *A/– ; B/–* (agutí)
3 *A/– ; b/b* (canela)
3 *a/a ; B/–* (negro)
1 *a/a ; b/b* (marrón)

En caballos, la crianza de líneas domesticadas ha eliminado el alelo *A* que determina el fenotipo agutí, aunque dicho alelo parece existir en algunos de sus parientes salvajes. El color que hemos llamado marrón en los ratones, se llama castaño en los caballos y este fenotipo también es recesivo frente al negro.



(a)



(b)

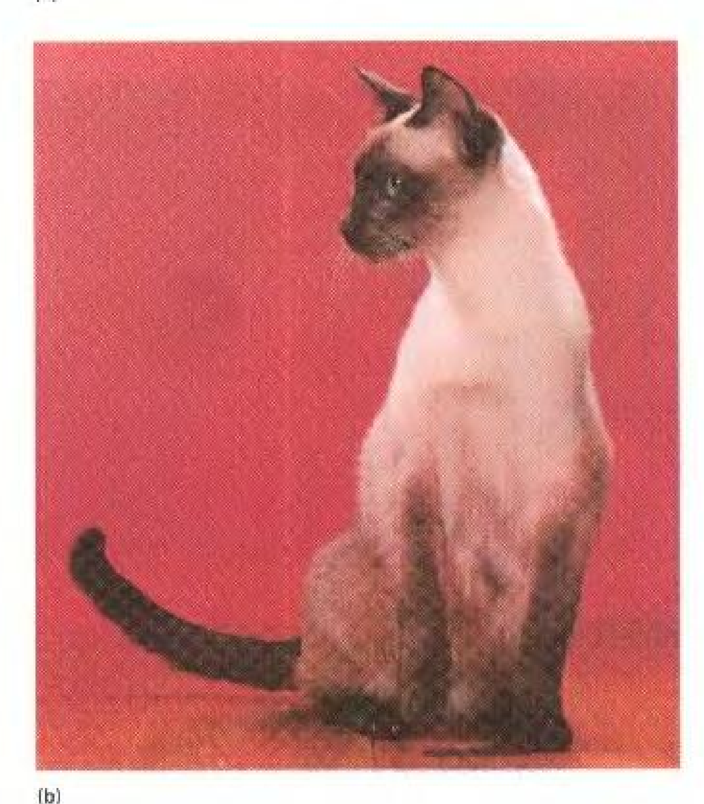
Figura 4-19. Albinismo en reptiles y aves. El fenotipo se debe en ambos casos a un alelo recesivo que provoca la incapacidad de las células de la piel para producir el pigmento oscuro melanina (el alelo normal determina la capacidad de sintetizar melanina). (a) Serpiente de cascabel. La coloración oscura normal de esta especie se debe enteramente a la melanina, así que el alelo albino produce un aspecto completamente blanco (K.H. Switak/NHPA). (b) Pingüino. En esta especie, la melanina es responsable del color negro de la mayor parte de las plumas, pero la coloración naranja-rojiza del pico y de las plumas de la cabeza se debe a otro pigmento no relacionado químicamente con la melanina. El alelo recesivo albino provoca ausencia de melanina, pero las zonas rojizas no se ven afectadas y retienen su aspecto normal (A.N.T./NHPA).

El gen *C*

El alelo silvestre *C* permite la aparición del color y el alelo *c* impide dicha aparición. La constitución *c/c* es epistática sobre todos los otros genes del color. Los animales *c/c*, que carecen de pigmento del pelaje, se llaman albinos. Los albinos son frecuentes en muchas especies de mamíferos y se han descrito también en aves, serpientes y peces (Fig. 4-19), y en nuestra especie (véase Cap. 1). Otro alelo del gen *C* es el alelo c^h o alelo *Himalaya*. Este alelo es una versión termosensible del alelo *c*. El alelo c^h



(a)



(b)



(c)

sólo es funcional, capaz de fabricar pigmento, en las extremi- des del cuerpo, que se encuentran a temperatura más baja. En la partes más cálidas del cuerpo, se comporta exactamente igu que el alelo «albino» *c*. La Figura 4-20 muestra un ratón Hima ya y la acción del mismo alelo en conejos y gatos. En estos úl mos produce el fenotipo siamés.

La constitución *c/c* produce la proporción característica de epistasia recesiva, como se observa en el siguiente cruzamien en el que ambos parentales son *a/a*:

B/B ; *c/c* (albino) × *b/b* ; *C/C* (marrón)
o *B/B* ; *C/C* (negro) × *b/b* ; *c/c* (albino)
↓
F_1 todos *B/b* ; *C/c* (negro)
B/b ; *C/c* (negro) × *B/b* ; *C/c* (negro)
↓

F_2	9 *B/–* ; *C/–*	(negro)	9
	3 *b/b* ; *C/–*	(marrón)	3
	3 *B/–* ; *c/c*	(albino)	4
	1 *b/b* ; *c/c*	(albino)	

El gen *D*

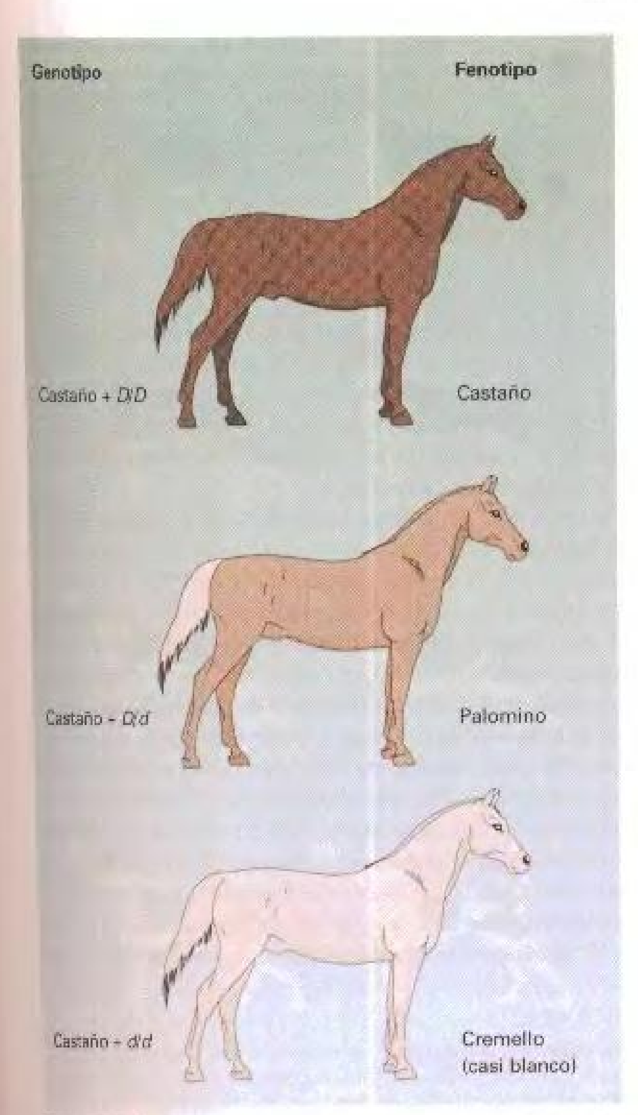
El gen *D* controla la intensidad de la pigmentación especifica- da por los otros genes relacionados con el color del pelaje. Lo genotipos *D/D* y *D/d* permiten la expresión de la coloración toda su intensidad, pero *d/d* «diluye» el color, provocando aspecto «lechoso». Este efecto se debe a la distribución des- gual del pigmento en la cubierta del pelo. Aparecen así lo fenotipos agutí diluido, canela diluido, marrón diluido y ne- gro diluido. Éste es otro ejemplo de gen modificador. En siguiente cruzamiento, suponemos que ambos parentales so *a/a* ; *C/C*:

B/B ; *d/d* (negro diluido) × *b/b* ; *D/D* (marrón)
o *B/B* ; *D/D* (negro) × *b/b* ; *d/d* (marrón diluido)
↓
F_1 todos *B/b* ; *D/d* (negro)
B/b ; *D/d* (negro) × *B/b* ; *D/d* (negro)
↓

F_2	9 *B/–* ; *D/–*	(negro)
	3 *B/–* ; *d/d*	(negro diluido)
	3 *b/b* ; *D/–*	(marrón)
	1 *b/b* ; *d/d*	(marrón diluido)

En los caballos, el alelo *D* presenta dominancia incomplet La Figura 4-21 muestra cómo la dilución afecta al aspecto de l caballos castaños y bayos. También se observan a menudo ca de dilución en gatos domésticos.

Figura 4-20. Los alelos sensibles a la temperatura del gen *C* produc fenotipos similares en varios mamíferos diferentes. Estos alelos reducen (o impiden completamente) la síntesis de melanina en la piel que recubre las regiones más cálidas del cuerpo. A temperaturas más bajas, como a las que se encuentran las extremidades del cuerpo, se sintetiza melanina. De ahí aparezcan más oscuros el hocico, las orejas, la cola y las patas. (a) Ratón himalaya (Anthony Griffiths). (b) Gato siamés (Walter Chandoha). (c) Conejos himalaya, a menudo usados como mascotas (Dan McCoy/Rain En los tres casos el genotipo es c^h/c^h.



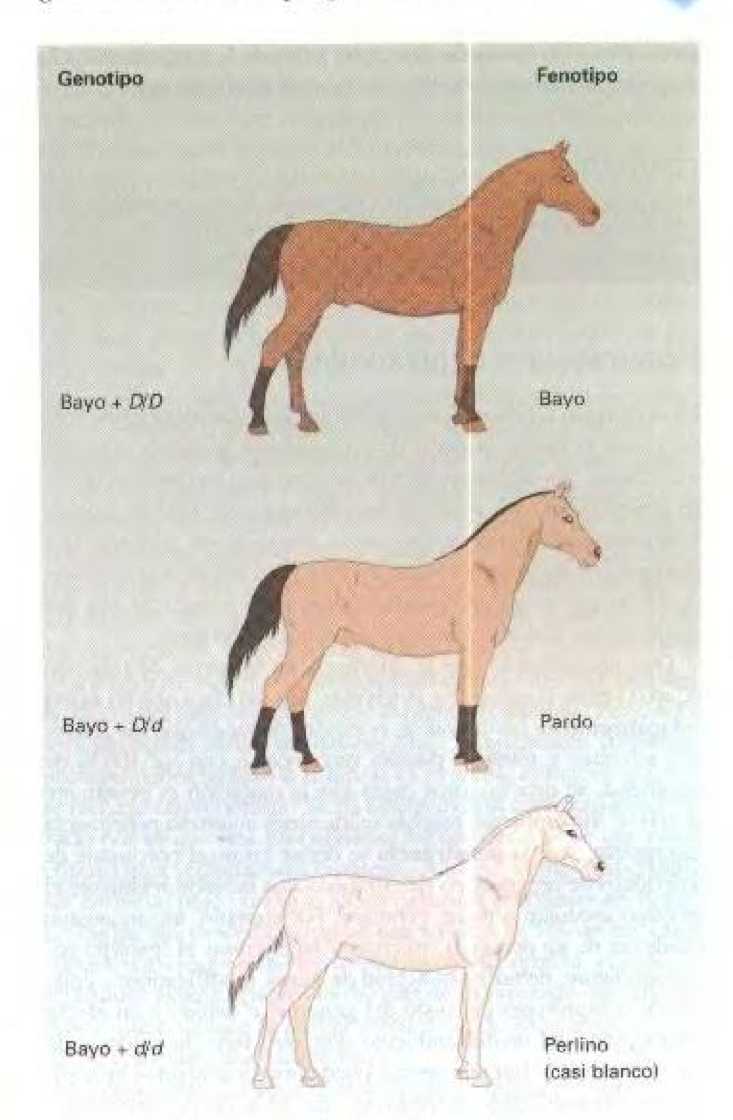


Figura 4-21. Efecto modificador de un alelo que causa «dilución» de los colores castaño y bayo, normales en los caballos. Obsérvese la dominancia incompleta mostrada por *D*. (De J.W. Evans et al., *The Horse*, Copyright © 1977 de W.H. Freeman and Company.)

El gen S

El gen *S* controla la distribución corporal del pigmento del pelaje. En efecto, controla la presencia o ausencia de manchas. El genotipo *S*/– determina la ausencia de manchas, mientras que el genotipo *s*/*s* induce un patrón de manchas conocido como *picazo* tanto en ratones como en caballos. Este patrón se impone sobre cualquiera de los colores de pelaje anteriormente descritos, con la excepción, por supuesto, del albino.

Resumiendo todo lo visto acerca del color del pelaje en los ratones: el aspecto normal en el pelaje de los ratones se produce por la acción combinada de una serie de genes que determinan el tipo de pigmento, su distribución en el pelo, respecto al cuerpo del animal, y la presencia o ausencia de pigmento. Tales interacciones se deducen de los cruzamientos en los que dos o más genes que interaccionan se encuentran en heterocigosis para alelos que modifican el color y el patrón normales del pelaje. En la Figura 4-22 se muestran algunos de los patrones de pigmentación en el

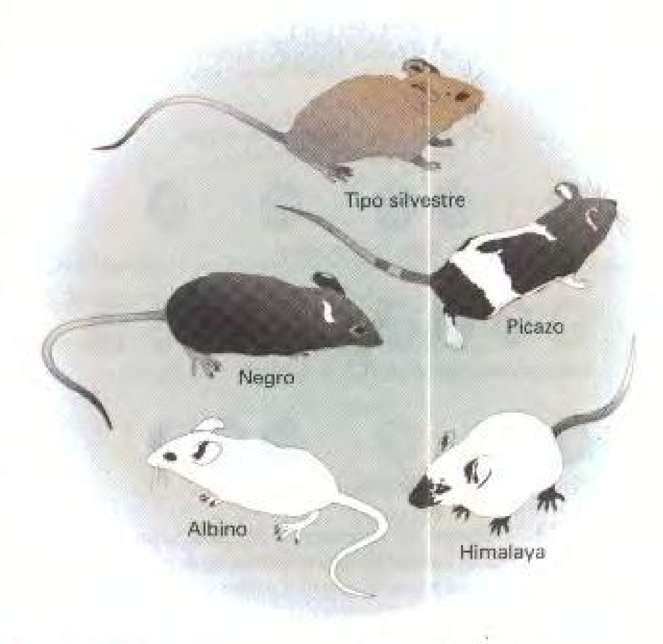


Figura 4-22. Algunos fenotipos de color del pelaje de los ratones.

ratón. Este tipo de interacción entre genes es la que determina la mayoría de las características de cualquier organismo.

COROLARIO

Los diferentes tipos de proporciones dihíbridas modificadas informan acerca de los diferentes modos en que los genes interactúan entre sí para determinar un fenotipo.

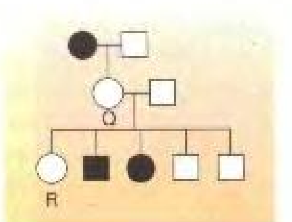


Figura 4-24. Falta de penetrancia ilustrada por un pedigrí de un alelo dominante. El individuo Q debe llevar el alelo (porque lo transmitió a sus descendientes), pero no se manifiesta en el fenotipo. No podemos estar seguros de si un individuo como R es portador del alelo.

Penetrancia y expresividad

En el ejemplo anterior, la base genética de la interdependencia de los genes se dedujo a partir de proporciones genéticas que eran muy claras. Sin embargo, sólo un número relativamente pequeño de genes cumple este requisito necesario para este tipo de análisis. Una propiedad importante es que la mutación no provoque una disminución en la supervivencia o fertilidad respecto al silvestre, de modo que no ocurra una desviación en la frecuencia con que aparecen las clases fenotípicas silvestres y mutantes.

Otra propiedad es que la diferencia en la norma de reacción (Cap. 1) entre el mutante y el silvestre sea tan clara que no exista solapamiento en las curvas de reacción, de modo que los fenotipos silvestre y mutante puedan reconocerse con un 100 % de seguridad. Se dice en estos casos que la mutación es penetrante al 100 %. Sin embargo, muchas mutaciones muestran penetrancia incompleta. Así, la **penetrancia** se define como el porcentaje de individuos de un genotipo determinado que muestra realmente el fenotipo asociado a dicho genotipo. Por ejemplo, un organismo puede ser de un genotipo concreto y no expresar el fenotipo correspondiente, debido a la acción de genes modificadores, epistáticos o supresores del resto del genoma, o debido a un efecto modificador del medio ambiente. Por otro lado, la carencia de una determinada función génica puede provocar efectos muy sutiles que son difíciles de medir en una situación de laboratorio.

Otro término que describe el rango de expresión fenotípica se conoce como **expresividad**. La expresividad mide el grado o la intensidad con que se expresa fenotípicamente un genotipo determinado. Las diferencias en el grado de expresión observadas en distintos individuos se debe a la constitución alélica del resto del genoma o a factores ambientales. La Figura 4-23 ilustra la diferencia entre penetrancia incompleta y expresividad variable. Como la penetrancia, la expresividad está comprendida en el concepto de norma de reacción.

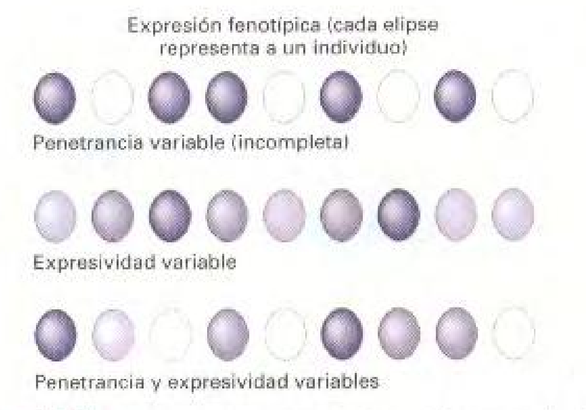


Figura 4-23. Esquema que representa los efectos de la penetrancia y la expresividad utilizando el carácter hipotético «intensidad de pigmentación». Todos los individuos de una misma fila tienen el mismo alelo, por ejemplo, *P*, que les confiere capacidad de producir pigmento. Sin embargo, efectos derivados del resto del genoma y del ambiente pueden suprimir o modificar la producción de pigmento en cada individuo.

Cualquier tipo de análisis genético, como el análisis de pedigríes humanos y las predicciones en el consejo o asesoramiento genético, puede verse muy dificultado a causa de los fenómenos de penetrancia incompleta y expresividad variable. Por ejemplo, si un alelo causante de una enfermedad no es totalmente penetrante (como ocurre a menudo), es complicado dar la garantía de no padecer la enfermedad a los miembros de una familia afectada (p. ej., al individuo *R* de la Figura 4-24 no se le puede asegurar que carezca del genotipo causante de la enfermedad y sus descendientes no la padezcan). Por otro lado, el análisis del pedigrí puede ser muy útil para identificar individuos que no expresan la enfermedad pero que claramente presentan el correspondiente genotipo (p. ej., el individuo Q de la Fig. 4-24). De forma similar, la expresividad variable puede dar lugar a diagnósticos equivocados. En la Figura 4-25 se muestra un ejemplo concreto de expresividad variable.

COROLARIO

Los términos *penetrancia* y *expresividad* cuantifican las modificaciones que sufre la expresión génica por influencias del medio ambiente y del fondo genético del organismo; miden el porcentaje de casos en los que el gen se expresa y la intensidad con que lo hace, respectivamente.

La prueba de χ^2

La razón por la que aparecen determinadas proporciones fenotípicas en sistemas muy bien caracterizados, como los expuestos en este capítulo, puede comprenderse con relativa sencillez. Pero el estudio de las interacciones genéticas implica en ocasiones el análisis de proporciones fenotípicas muy complicadas de interpretar. En una situación experimental concreta en la que aparecen diversos fenotipos entre la descendencia de un cruzamiento, puede no resultar obvio a primera vista el significado de las proporciones observadas por el investigador. Llegados a este punto, es necesario establecer una hipótesis que explique los resultados obtenidos. El paso siguiente es determinar si los datos observados se ajustan a la hipótesis formulada.

En la investigación científica, a menudo es necesario comparar los números con que aparecen los elementos de diversas categorías en un experimento con los números que predice una hipótesis. Por ejemplo, se podría tratar de verificar si la relación

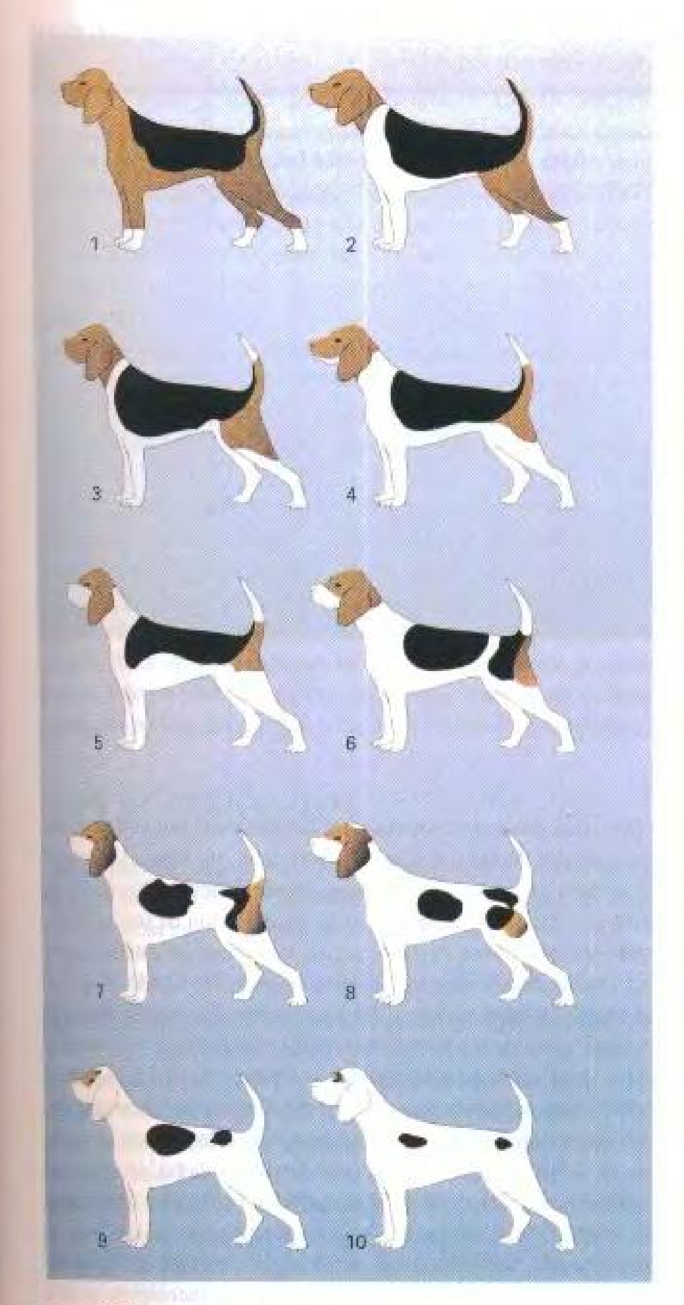


Figura 4-25. Expresividad variable demostrada por diez grados de aparición de manchas tipo picazo en perros de la raza beagle. Cada uno de estos perros tiene el alelo s^p, responsable de la aparición de este tipo de manchas en los perros. (Adaptado de Clarence C. Little, *The Inheritance of Coat Color in Dogs*, Cornell University Press, 1957, y de Giorgio Schreiber, *Journal of Heredity* 9, 1930, 403.)

sexos en una determinada población de insectos se ajusta a la proporción 1:1, como cabría esperar. Si los resultados se ajustan mucho, entonces se acepta la hipótesis. En cambio, si los resultados se ajustan poco o se alejan de la proporción 1:1, la hipótesis se rechaza. Naturalmente, debe existir un criterio que establezca si los números observados se ajustan suficientemente a los esperados como para aceptar la hipótesis. Cuando las aproximaciones o las desviaciones respecto a los datos observados son muy acentuadas, esto no supone ningún problema, pero hay ocasiones en que no resulta evidente si las observaciones experimentales se ajustan o no a la hipótesis propuesta. Durante el análisis genético, a menudo es necesario interpretar los números en que aparecen las diversas clases fenotípicas. En tales casos, se utiliza un procedimiento estadístico conocido como la prueba de la χ^2 (chi al cuadrado) para decidir si se acepta o se rechaza la hipótesis.

La prueba de la χ^2 no es más que una manera de cuantificar las diversas desviaciones que se producen al azar cuando la hipótesis es correcta. Por ejemplo, consideremos una hipótesis simple, que cierta planta es heterocigótica (monohíbrida) *A/a*. Para poner a prueba esta hipótesis, tendríamos que realizar un retrocruzamiento con una planta *a/a* y predecir la aparición entre la descendencia de una proporción 1:1 entre plantas *A/a* y plantas *a/a*. Incluso cuando la hipótesis se cumple, no podemos esperar siempre una relación 1:1 exacta. Podemos representar este experimento con un barril lleno de canicas rojas y azules en igual número. Si extraemos sin mirar muestras de 100 canicas, deberíamos esperar que a menudo se produjeran pequeñas desviaciones del tipo 52 rojas: 48 azules y, menos frecuentemente, grandes desviaciones, tales como 60 rojas: 40 azules. La prueba de la χ^2 nos permite calcular la probabilidad de que tales desviaciones producto del azar ocurran siendo la hipótesis correcta. Pero, si ya se contemplan todas las desviaciones asignándoles diferentes probabilidades incluso si la hipótesis es cierta, entonces ¿cuándo se rechaza una hipótesis? Se ha establecido el convenio generalizado por el que una probabilidad menor del 5 % se usa como criterio para rechazar una hipótesis. Aún así, la hipótesis podría ser correcta, pero en algún punto debemos establecer un límite. La lógica del procedimiento es que sólo en el 5 % de los casos corremos el riesgo de rechazar una hipótesis correcta, cuando los resultados experimentales se desvían de lo esperado más allá del límite que establece la probabilidad del 5 %. Este nivel de errores se considera muy aceptable.

Consideremos un caso de interacción genética. Cruzamos dos líneas puras de plantas, una con pétalos amarillos y otra con pétalos rojos. Los individuos de la F_1 tienen todos pétalos de color naranja. Cuando la F_1 se autofertiliza para obtener la F_2, encontramos los siguientes resultados:

naranja	182
amarillo	61
rojo	77
Total	320

¿Qué hipótesis podemos elaborar para explicar estos resultados? Al menos hay dos posibilidades:

Hipótesis 1. Dominancia incompleta

(amarillo) *G1/G1* × *G2/G2* (rojo)

F_1 *G1/G2* (naranja)

			Valores esperados
F_2	$\frac{1}{4}$ *G1/G1*	(amarillo)	80
	$\frac{1}{2}$ *G1/G2*	(naranja)	160
	$\frac{1}{4}$ *G2/G2*	(rojo)	80

Hipótesis 2. Epistasia recesiva de *r* (rojo) sobre *Y* (naranja) e *y* (amarillo)

(amarillo) *y/y* ; *R/R* × *Y/Y* ; *r/r* (rojo)

CUADRO 4-1. Valores críticos de la distribución de χ^2

	P									
df	0.995	0.975	0.9	0.5	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	df
1	.000	.000	0.016	0.455	2.706	3.841	5.024	6.635	7.879	1
2	0.010	0.051	0.211	1.386	4.605	5.991	7.378	9.210	10.597	2
3	0.072	0.216	0.584	2.366	6.251	7.815	9.348	11.345	12.838	3
4	0.207	0.484	1.064	3.357	7.779	9.488	11.143	13.277	14.860	4
5	0.412	0.831	1.610	4.351	9.236	11.070	12.832	15.086	16.750	5
6	0.676	1.237	2.204	5.348	10.645	12.592	14.449	16.812	18.548	6
7	0.989	1.690	2.833	6.346	12.017	14.067	16.013	18.475	20.278	7
8	1.344	2.180	3.490	7.344	13.362	15.507	17.535	20.090	21.955	8
9	1.735	2.700	4.168	8.343	14.684	16.919	19.023	21.666	23.589	9
10	2.156	3.247	4.865	9.342	15.987	18.307	20.483	23.209	25.188	10
11	2.603	3.816	5.578	10.341	17.275	19.675	21.920	24.725	26.757	11
12	3.074	4.404	6.304	11.340	18.549	21.026	23.337	26.217	28.300	12
13	3.565	5.009	7.042	12.340	19.812	22.362	24.736	27.688	29.819	13
14	4.075	5.629	7.790	13.339	21.064	23.685	26.119	29.141	31.319	14
15	4.601	6.262	8.547	14.339	22.307	24.996	27.488	30.578	32.801	15

			Valores esperados
F_1	Y/y ; R/r (naranja)		
F_2	$\frac{9}{16}$ $Y/-$; $R/-$	(naranja)	180
	$\frac{3}{16}$ y/y ; $R/-$	(amarillo)	60
	$\frac{3}{16}$ $Y/-$; r/r	(rojo)	
	$\frac{1}{16}$ y/y ; r/r	(rojo)	80

El valor de χ^2 se calcula siempre con números enteros, no con porcentajes, proporciones o fracciones. Por tanto, el tamaño de la muestra es muy importante en la prueba de χ^2, como sucede en cualquier situación donde se consideran fenómenos que suceden al azar. Las muestras a ensayar suelen estar compuestas de varias clases o categorías. La letra O se utiliza para representar el valor observado para una clase determinada, y E representa el valor esperado para esa misma clase según las predicciones de la hipótesis. La fórmula general para calcular χ^2 es:

La suma de $(O - E)^2/E$ para todos los casos

En el caso de la hipótesis 1, el cálculo sería:

	O	E	$(O-E)^2$	$(O-E)^2/E$
naranja	182	160	484	3.0
amarillo	61	80	361	4.5
rojo	77	80	9	0.1
				$\chi^2 = 7.6$

Para convertir el valor de χ^2 en una probabilidad, utilizamos el Cuadro 4-1, que muestra los valores de χ^2 para diferentes grados de libertad (df, del inglés *degree of freedom*). Para cualquier valor total de la descendencia, si se conoce el número de individuos de dos de las tres clases fenotípicas, entonces el tamaño de la tercera clase se determina automáticamente. Por tanto, hay sólo dos *grados de libertad* en la distribución de los individuos entre las tres clases. Normalmente, el número de grados de libertad (representado por las diferentes filas del Cuadro 4-1) es el número de clases menos 1. En este caso es 3 − 1 = 2. Observando la línea que corresponde a dos grados de libertad, vemos que el valor de χ^2 sitúa la probabilidad en menos de 0.025, es decir, el 2.5 %. Esto significa que, si la hipótesis es cierta, ocurrirán desviaciones como éstas o mayores respecto a los valores esperados en un 2.5 % de las veces. Como ya se ha dicho, se utiliza por convenio el valor de 5 % como frontera para tomar una decisión de aceptación o rechazo. Cuando se obtienen valores menores que este 5 %, la hipótesis se rechaza por ser demasiado improbable. Por tanto, la hipótesis de dominancia incompleta se debe rechazar.

En el caso de la hipótesis 2, el cálculo sería:

	O	E	$(O-E)^2$	$(O-E)^2/E$
naranja	182	180	4	0.02
amarillo	61	60	1	0.02
rojo	77	80	9	0.11
				$\chi^2 = 0.15$

El valor de la probabilidad (para dos grados de libertad) esta vez es mayor de 0.9, o sea, el 90 %. Por tanto, desviaciones como las observadas presentan una probabilidad de aparecer aproximadamente el 90 % de las veces, es decir, muy a menudo. Como el 90 % es mucho mayor que el 5 %, concluimos que los resultados apoyan la hipótesis de epistasia recesiva.

RESUMEN

Aunque el análisis genético permite identificar un gen concreto cuyos alelos determinan dos alternativas fenotípicas de un carácter, dicho gen no controla por sí mismo el carácter; el gen debe interactuar con muchos otros genes del genoma. Existen dos tipos de interacciones: (1) entre alelos de un gen concreto, y (2) entre alelos de genes diferentes. La prueba de complementación indica si dos fenotipos mutantes relacionados, determinados por alelos recesivos, se deben a mutaciones en un gen o en dos genes diferentes. Los genotipos mutantes se reúnen en un individuo de la F_1, y si el fenotipo es mutante se dice que no hay complementación y los dos alelos deben estar en el mismo gen. Si se observa complementación, los alelos deben estar en genes diferentes.

Los alelos de un gen interactúan de varias formas. En primer lugar, sus acciones celulares específicas dan lugar a variaciones en la dominancia: la dominancia incompleta se produce por la presencia de cantidades intermedias de proteína en el heterocigoto y la codominancia ocurre por la producción de dos productos proteicos diferentes. Los alelos también interactúan mediante una especie de efecto de dosis: un alelo mutante en heterocigosis podría producir un efecto deletéreo débil, mientras que las dos dosis de un mutante homocigoto podrían causar graves efectos o incluso ser mortales.

La interacción entre alelos de genes diferentes puede detectarse mediante observación de proporciones dihíbridas modificadas con relación a la 9:3:3:1. Las mutaciones en genes de una ruta concreta dan lugar a proporciones 9:7 si los fenotipos mutantes son iguales, o a 9:3:4 si los fenotipos mutantes son diferentes. Se dice de la proporción 9:3:4 que se produce por epistasia recesiva, situación en la cual una mutación en una de las primeras proteínas que actúan en la ruta elimina la acción de otro gen cuya proteína actúa más tarde en la ruta. Otro tipo de interacción entre dos genes es la supresión: las mutaciones supresoras convierten en silvestres fenotipos mutantes causados por alelos mutantes de otro locus.

Penetrancia es la proporción de individuos en los que se expresa una mutación, y expresividad es la intensidad del fenotipo atribuido a un alelo. La penetrancia y expresividad variables están provocadas por interacciones con otros genes y con el medio ambiente.

Los valores observados en una determinada proporción fenotípica se pueden contrastar con los valores esperados en función de una hipótesis concreta, haciendo uso de la prueba de χ^2.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, relacionando entre sí tantos de los siguientes términos como le sea posible. Observe que los conceptos no están en ningún orden concreto.

dihíbrido / proporción 9:3:4 / distribución independiente / ruta bioquímica / epistasia recesiva / interacción génica / meiosis / silvestre

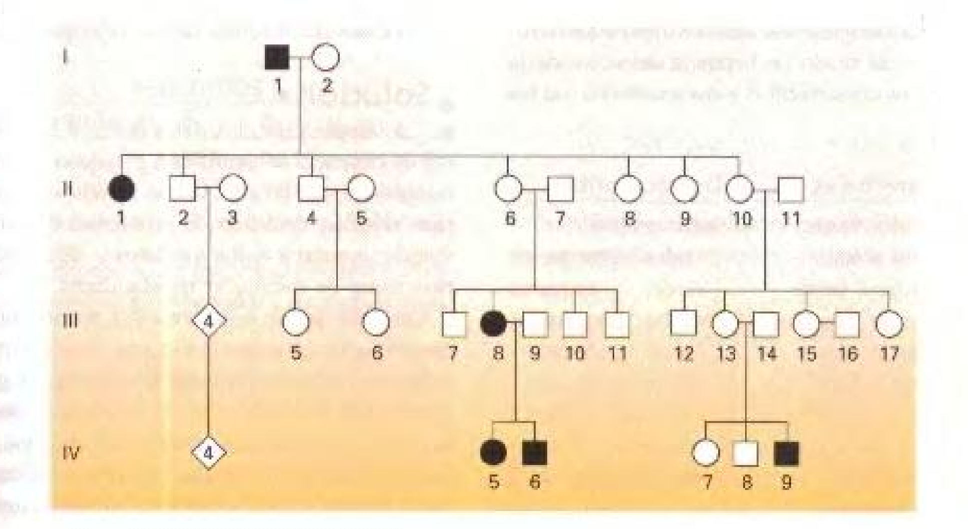
PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

La mayoría de los pedigríes muestran que la polidactilia (Fig. 2-22) se hereda como un rasgo autosómico dominante, pero los pedigríes de algunas familias no se ajustan al patrón esperado para tal tipo de herencia. Un pedigrí de esta clase se observa en la figura adjunta (Las cifras en los rombos establecen el número de personas no afectadas, independientemente de su sexo).

a. ¿Qué irregularidades muestra este pedigrí?

b. ¿Qué fenómeno genético ilustra este pedigrí?

c. Sugiera un mecanismo concreto de interacción genética que pudiera producir tal pedigrí, mostrando los genotipos de los miembros relevantes de la familia.



♦ Solución ♦

a. Lo que cabe esperar de un rasgo autosómico dominante es que cada individuo afectado tenga un progenitor afectado, pero esta premisa no se cumple siempre en este pedigrí, lo que constituye una irregularidad. ¿Cómo podemos explicar esto?

¿Podrían existir algunos casos de polidactilia ocasionados por disfunciones en un gen distinto, digamos que generando un patrón dominante ligado al sexo? Incluso así, tendríamos que explicar todavía la ausencia del rasgo en los individuos II-6 y II-10. Por otra parte, sugerir un tipo de herencia recesiva, sea autosómica o ligada al sexo, requeriría que muchos de los individuos del árbol fueran heterocigotos, lo cual no concuerda con la baja frecuencia con que aparece la polidactilia.

b. Por tanto, concluimos que la polidactilia no siempre es completamente penetrante. En este capítulo, hemos aprendido que algunos individuos que tienen el genotipo que se corresponde con un determinado fenotipo no expresan éste. En el pedigrí, los individuos II-6 y II-10 parecen pertenecer a esta categoría; parece claro que poseen el alelo de la polidactilia, heredado de I-1 pues lo transmiten a sus descendientes.

c. También hemos visto en este capítulo que la penetrancia incompleta de un alelo surge mediante la supresión de su expresión, bien por influencias ambientales o por interacción con los alelos de otros genes. Para dar una explicación genética, debemos formular una hipótesis genética. ¿Qué tenemos que explicar? La clave se encuentra en que el individuo I-1 transmite el alelo a dos tipos de descendientes. El primer tipo, representado por II-1, que sí expresa el carácter; y el segundo tipo de descendientes, representado por II-6 y II-10, que no lo hacen (a partir del pedigrí no podemos saber si los otros descendientes de I-1 han recibido o no el alelo de la polidactilia). ¿Está operando un fenómeno de supresión génica? I-1 no posee un alelo supresor porque expresa la polidactilia. La única persona que podría transmitir un alelo supresor es I-2. Además, I-2 debiera ser heterocigótica para dicho alelo supresor ya que, al menos uno de sus descendientes expresa la polidactilia. Por tanto, hemos formulado una hipótesis por la que el apareamiento inicial debió ser:

$$(\text{I-1})\ P/p \cdot s/s \times (\text{I-2})\ p/p \cdot S/s$$

donde S es el alelo supresor y P es el alelo responsable de la polidactilia. Con esta hipótesis, podemos predecir que los descendientes estarán contenidos en las siguientes cuatro categorías (si los genes segregan independientemente):

Genotipo	Fenotipo	Ejemplo
$P/p \cdot S/s$	normal (suprimido)	II-6, II-10
$P/p \cdot s/s$	polidactilia	II-1
$p/p \cdot S/s$	normal	
$p/p \cdot s/s$	normal	

Si S es muy infrecuente, los descendientes de II-6 y II-10 serán probablemente de alguna de las clases siguientes:

Genotipo	Ejemplo
$P/p \cdot S/s$	III-13
$P/p \cdot s/s$	III-8
$p/p \cdot S/s$	
$p/p \cdot s/s$	

No se puede descartar la posibilidad de que II-2 y II-4 tengan el genotipo $P/p \cdot S/s$ y que, por azar, ninguno de sus descendientes se vea afectado.

Observe que sólo hemos utilizado conceptos que aparecen en el Capítulo 1 (efectos ambientales), Capítulo 2 (herencia mendeliana), Capítulo 3 (localización de los genes en cromosomas) y Capítulo 4 (interacciones génicas).

PROBLEMAS RESUELTOS

1. En cierta especie de escarabajo, la cubierta de las alas puede ser verde, azul o turquesa. A partir de una población polimórfica de laboratorio, se escogieron hembras vírgenes y se cruzaron para determinar el modo de herencia del color de la cubierta de las alas. Los cruzamientos y sus resultados son los que siguen:

Cruzamiento	Parentales	Descendientes
1	azul × verde	todos azules
2	azul × azul	$\frac{3}{4}$ azules : $\frac{1}{4}$ turquesas
3	verde × verde	$\frac{3}{4}$ verdes : $\frac{1}{4}$ turquesas
4	azul × turquesa	$\frac{1}{2}$ azules : $\frac{1}{2}$ turquesas
5	azul × azul	$\frac{3}{4}$ azules : $\frac{1}{4}$ verdes
6	azul × verde	$\frac{1}{2}$ azules : $\frac{1}{2}$ verdes
7	azul × verde	$\frac{1}{2}$ azules : $\frac{1}{4}$ verdes $\frac{1}{4}$ turquesas
8	turquesa × turquesa	todos turquesas

a. Averigüe la base genética del color del ala en esta especie.
b. Indique los genotipos de todos los parentales y descendientes de la forma más completa posible.

♦ Solución ♦

a. A simple vista, los datos parecen complicados, pero la forma de herencia se manifiesta pronto si consideramos los cruzamientos de uno en uno. Como hemos visto, un principio general para resolver este tipo de problemas es comenzar echando un vistazo general a todos los datos y agrupando los cruzamientos para tratar de establecer regularidades.

Una pista que se descubre en un primer vistazo es que todas las proporciones corresponden a una situación monogénica; no hay ninguna prueba de que estén implicados dos genes distintos. ¿Cómo explicar con un solo gen la variabilidad observada? La respuesta obvia es que hay una variación en el propio gen, es decir, alelismo múltiple. Quizás existan tres alelos. Llamemos a a este gen (por color del ala) y representemos a los alelos como a^v, a^a y a^t. Tene-

mos ahora un problema adicional, establecer la dominancia entre esos alelos.

El cruzamiento 1 da información sobre dominancia, porque la descendencia de un cruzamiento azul × verde es toda de color azul; por tanto, el color azul parece dominar sobre el verde. Esta conclusión se ve apoyada por el cruzamiento 5 en el que el determinante verde debe haber estado presente en los parentales para aparecer en la descendencia. El cruzamiento 3 da información acerca de los determinantes para el color turquesa, que deben haber estado presentes en los parentales, aunque sin expresarse, ya que se manifiestan en la descendencia. Por tanto, el color verde es dominante sobre el turquesa. Así, hemos establecido un modelo en el cual la dominancia es: $a^a > a^v > a^t$. Ciertamente, la posición asignada al alelo a^t al final de la serie es apoyada por el resultado del cruzamiento 7, donde aparecen descendientes color turquesa de un cruzamiento azul × verde.

b. Deducir los genotipos ahora es una tarea sencilla. Observe que el problema establece que los parentales se han obtenido a partir de una población polimórfica; ello significa que pueden ser homocigóticos (por ejemplo, a^a/a^a) o heterocigóticos (a^a/a^t o a^a/a^v). Aquí se requieren pruebas de ensayo y error y un poco de sentido común, pero la pregunta ha sido ya prácticamente respondida y todo lo que queda es «culminar los detalles». Los siguientes genotipos explican los resultados. Un guión indica que el genotipo puede ser homocigótico o heterocigótico, por tener un alelo inferior en la serie alélica.

Cruzamiento	Parentales	Descendientes
1	$a^a/a^a \times a^v/-$	a^a/a^v o $a^a/-$
2	$a^a/a^t \times a^a/a^t$	$\frac{3}{4}\ a^a/- : \frac{1}{4}\ a^t/a^t$
3	$a^v/a^t \times a^v/a^t$	$\frac{3}{4}\ a^v/- : \frac{1}{4}\ a^t/a^t$
4	$a^a/a^t \times a^t/a^t$	$\frac{1}{2}\ a^a/a^t : \frac{1}{2}\ a^t/a^t$
5	$a^a/a^v \times a^a/a^v$	$\frac{3}{4}\ a^a/- : \frac{1}{4}\ a^v/a^v$
6	$a^a/a^v \times a^v/a^v$	$\frac{1}{2}\ a^a/a^v : \frac{1}{2}\ a^v/a^v$
7	$a^a/a^t \times a^v/a^t$	$\frac{1}{2}\ a^a/- : \frac{1}{4}\ a^v/a^t : \frac{1}{4}\ a^t/a^t$
8	$a^t/a^t \times a^t/a^t$	todos a^t/a^t

2. Las hojas de la piña o ananás pueden clasificarse en tres tipos: espinosas (E), de punta espinosa (PE) y sin espinas (S). En cruzamientos entre varias líneas puras seguidos de cruzamientos entre sí de los individuos de la F_1 se obtienen los siguientes resultados:

	FENOTIPOS		
Cruzamientos	Parenteral	F_1	F_2
1	PE × E	PE	99 PE : 34 E
2	S × PE	S	120 S : 39 PE
3	S × E	S	95 S : 25 PE : 8 E

a. Defina símbolos genéticos con letras y explique los resultados en términos de los genotipos obtenidos y sus proporciones.

b. Usando el modelo de la parte a, determine las proporciones fenotípicas esperadas al cruzar: (1) la descendencia F_1 del cruzamiento «sin espinas» × «espinosa» con la línea parental «espinosa» y (2) la descendencia F_1 del cruzamiento «sin espinas» × «espinosa» con la F_1 del cruzamiento «espinosa» × «punta espinosa».

♦ Solución ♦

a. Analicemos primero las proporciones de la F_2. Se observan claramente proporciones 3:1 en los cruzamientos 1 y 2, lo que es indicativo de segregaciones monogénicas. Sin embargo, el cruzamiento 3 muestra unas proporciones que seguramente corresponden a una segregación 12:3:1. ¿Cómo sabemos esto? Simplemente porque no existen muchas segregaciones genéticas complejas, y una prueba de error y ensayo nos lleva rápidamente a la proporción 12:3:1. En un número total de 128 descendientes esperaríamos los números 96:24:8, y los números reales obtenidos se corresponden bastante bien con los esperados.

Uno de los principios de este capítulo es que las proporciones mendelianas modificadas revelan la existencia de interacciones genéticas. El resultado del cruzamiento 3 da una F_2 en la que se observa una proporción mendeliana dihíbrida modificada, así que estamos probablemente ante una interacción entre dos genes. Este parece un punto de partida prometedor para empezar a resolver el problema; luego volveremos a los cruzamientos 1 y 2 y trataremos de encajar sus resultados.

Cualquier proporción dihíbrida se basa en las proporciones fenotípicas 9:3:3:1. Nuestra modificación las agrupa de la siguiente manera:

9 $A/-$; $B/-$ 3 $A/-$; b/b	} 12 sin espinas
3 a/a ; $B/-$	3 punta espinosa
1 a/a ; b/b	1 espinosa

Así que, sin preocuparnos del nombre de este tipo de interacción génica (que además no nos lo preguntan), podemos ya definir nuestros tres fenotipos de hoja en función de las parejas de alelos definidas A/a y B/b:

sin espinas = $A/-$ (B/b irrelevante)
punta espinosa = a/a ; $B/-$
espinosa = a/a ; b/b

¿Qué puede decirse acerca de los parentales del cruzamiento 3? El parental espinoso debe ser a/a ; b/b, y como se necesita el gen B para producir individuos de punta espinosa en la F_2, el parental sin espinas debe ser A/A ; B/B (recuerde que el problema nos dice que todos los parentales son líneas puras homocigóticas). Por tanto, la F_1 debe ser A/a ; B/b.

No necesitamos más razonamientos para describir el cruzamiento 1 como sigue:

$$a/a\ ;\ B/B \times a/a\ ;\ b/b \longrightarrow a/a\ ;\ B/b \begin{cases} \rightarrow \frac{3}{4}\ a/a\ ;\ B/b \\ \rightarrow \frac{1}{4}\ a/a\ ;\ b/b \end{cases}$$

Lo mismo ocurre con el cruzamiento 2, que podemos representar, usando los mismos símbolos arbitrarios, como:

$$A/A\ ;\ -/- \times a/a\ ;\ B/B \longrightarrow A/a\ ;\ B/- \begin{cases} \rightarrow \frac{3}{4}\ A/-\ ;\ -/- \\ \rightarrow \frac{1}{4}\ a/a\ ;\ B/- \end{cases}$$

Sabemos que la F_2 del cruzamiento 2 muestra segregación monogénica y parece que está implicado el par alélico A/a. Pero el alelo B es necesario para producir el fenotipo de punta espinosa, por lo que todos los individuos deben ser homocigóticos B/B:

$$A/A \,;\, B/B \times a/a \,;\, B/B \longrightarrow A/a \,;\, B/B \begin{cases} \to \tfrac{3}{4}\, A/- \,;\, B/B \\ \to \tfrac{1}{4}\, a/a \,;\, B/B \end{cases}$$

Observe que las dos segregaciones monogénicas de los cruzamientos 1 y 2 no demuestran que los genes *no* estén interactuando. Lo que observamos es que la interacción entre los dos genes no se *revela* en estos cruzamientos: sólo se revela en el cruzamiento 3, cuya F_1 es heterocigótica para ambos genes.

b. Todo consiste ahora en aplicar las leyes de la segregación y la distribución independientes para predecir la descendencia.

(1) $A/a \,;\, B/b \times a/a \,;\, b/b \longrightarrow$ (distribución independiente en un cruzamiento de prueba normal)

- $\tfrac{1}{4}\, A/a \,;\, B/b$ } sin espinas
- $\tfrac{1}{4}\, A/a \,;\, b/b$ } sin espinas
- $\tfrac{1}{4}\, a/a \,;\, B/b$ punta espinosa
- $\tfrac{1}{4}\, a/a \,;\, b/b$ espinosa

(2) $A/a \,;\, B/b \times a/a \,;\, B/b \longrightarrow$

- $\tfrac{1}{2}\, A/a$ → $\tfrac{3}{4}\, B/- \longrightarrow \tfrac{3}{8}$ } $\tfrac{1}{2}$ sin espinas
- $\tfrac{1}{2}\, A/a$ → $\tfrac{1}{4}\, b/b \longrightarrow \tfrac{1}{8}$ } $\tfrac{1}{2}$ sin espinas
- $\tfrac{1}{2}\, a/a$ → $\tfrac{3}{4}\, B/- \longrightarrow \tfrac{3}{8}$ punta espinosa
- $\tfrac{1}{2}\, a/a$ → $\tfrac{1}{4}\, b/b \longrightarrow \tfrac{1}{8}$ espinosa

PROBLEMAS

1. Si un hombre del grupo sanguíneo AB se casa con una mujer del grupo A cuyo padre pertenecía al grupo O, ¿a qué grupos sanguíneos se puede esperar que pertenezcan los hijos de este hombre y esta mujer?

2. Las plumas de los gallos Erminette son en su mayoría de color pálido, pero algunas son negras, lo que les da un aspecto moteado. Un cruzamiento entre dos individuos de esta raza produjo 48 descendientes, de los cuales 22 eran moteados, 14 negros y 12 completamente blancos. ¿Qué sugieren estos datos acerca de la base genética del tipo moteado? ¿Cómo comprobaría su hipótesis?

3. Los rábanos pueden ser largos, redondos u ovalados. Al mismo tiempo pueden ser rojos, blancos o de color violeta. Si se cruza una variedad larga y de color blanco con otra redonda y roja, se obtiene una F_1 uniforme ovalada y violeta. La F_2 muestra 9 clases fenotípicas distribuidas de la siguiente forma: 9 largos, rojos; 15 largos, violeta; 19 ovalados, rojos; 32 ovalados, violeta; 8 largos, blancos; 16 redondos, violeta; 8 redondos, blancos; 16 ovalados, blancos y 9 redondos, rojos.

   a. Encuentre una explicación genética para estos resultados. Defina los genotipos y muestre la constitución de los parentales, la F_1 y la F_2.

   b. Realice una predicción acerca de las proporciones genotípicas y fenotípicas en la descendencia de un cruzamiento entre una línea de rábanos largos y violetas y otra línea de rábanos ovalados y violetas.

4. En la serie alélica múltiple que controla el color del pelaje de los conejos, C^+ determina agutí, C^{ch} chinchilla y C^h, Himalaya. La dominancia ocurre en el orden $C^+ > C^{ch} > C^h$. En un cruzamiento de $C^+/C^{ch} \times C^{ch}/C^h$, ¿qué proporción de los descendientes será Himalaya?

5. Negro, sepia, crema y albino son colores del pelaje de conejillos de Indias de laboratorio. Se cruzaron entre sí animales individuales (no necesariamente líneas puras) que presentaban dichos colores; los resultados se muestran en la tabla adjunta, donde se usa la abreviatura A para albino, N para negro, C para crema y S para sepia. Los fenotipos fueron:

Cruzamientos	Fenotipos parentales	FENOTIPOS DE LA DESCENDENCIA N	S	C	A
1	N × N	22	0	0	7
2	N × A	10	9	0	0
3	C × C	0	0	34	11
4	S × C	0	24	11	12
5	N × A	13	0	12	0
6	N × C	19	20	0	0
7	N × S	18	20	0	0
8	N × S	14	8	6	0
9	S × S	0	26	9	0
10	C × A	0	0	15	17

   a. Deduzca el modo de herencia de estos colores del pelaje, eligiendo sus propios símbolos genéticos. Indique los genotipos de todos los parentales y los descendientes.

   b. Si se cruzan entre sí los descendientes negros de los cruzamientos 7 y 8, ¿qué proporciones se obtendrían según su modelo?

6. En un centro de maternidad han confundido a cuatro recién nacidos de forma accidental. Se sabe que los tipos ABO de los cuatro bebés son O, A, B y AB. Se analizan entonces los tipos ABO de las cuatro parejas de padres. Indique qué bebé pertenece a cada pareja de padres, que son: **(a)** AB × O, **(b)** A × O, **(c)** A × AB, y **(d)** O × O.

7. Consideremos dos tipos de polimorfismos referentes a grupos sanguíneos que poseemos los humanos, además de los

correspondientes al sistema ABO. Los alelos L^M y L^N determinan los grupos sanguíneos M, N y MN. El alelo dominante *R* de otro gen, origina que las personas que lo contienen presenten el fenotipo Rh$^+$ (rhesus positivo), mientras que los homocigotos para el alelo recesivo *r* son Rh$^-$ (rhesus negativo). Dos varones se disputan un caso de paternidad ante el juez, reclamando ambos ser el padre de tres hijos. Los grupos sanguíneos de los dos varones, de los hijos y de la madre son los siguientes:

Persona	Grupo sanguíneo		
Marido	O	M	Rh$^+$
Amante de la esposa	AB	MN	Rh$^-$
Esposa	A	N	Rh$^+$
Hijo 1	O	MN	Rh$^+$
Hijo 2	A	N	Rh$^+$
Hijo 3	A	MN	Rh

¿Puede establecerse la paternidad de los hijos a partir de estos datos?

8. En un rancho de zorros de Wisconsin, aparece una mutación que da color platino a la piel. Este color resulta muy apreciado por los compradores de pieles de zorro, pero el criador no consigue establecer una línea pura de color platino. Cada vez que cruza dos individuos de color platino, aparecen descendientes normales. Así, tras repetidos cruzamientos del tipo indicado, se han producido un total de 82 individuos de color platino y 38 normales, siendo éste un resultado típico de los demás cruzamientos similares. Establezca una hipótesis genética *concisa* que dé cuenta de estos hechos.

9. Hans Nachtsheim investigó durante varios años una anomalía hereditaria de los leucocitos de la sangre de los conejos. Esta anomalía, denominada *anomalía de Pelger*, supone normalmente el bloqueo de la segmentación típica de los núcleos de ciertos leucocitos y no parece que resulte grave para los conejos.

a. Cuando cruzó conejos con la anomalía típica de Pelger con conejos de una línea pura normal, Nachtsheim contó 217 descendientes con la anomalía de Pelger y 237 normales. ¿Cuál parece ser la base genética de esta anomalía?

b. Al cruzar dos conejos con la anomalía de Pelger, Nachtsheim encontró 223 descendientes normales, 439 con la anomalía de Pelger y 39 gravemente anormales. Estos últimos no sólo mostraban leucocitos defectuosos, sino que presentaban deformidades muy graves en el sistema esquelético; casi todos murieron poco después del nacimiento. En términos genéticos, ¿qué supone que representan estos individuos extremadamente defectuosos? ¿Por qué cree que sólo aparecieron 39 de ellos?

c. ¿Qué nuevas puebas experimentales podría obtener para apoyar o rechazar su respuesta a la cuestión b?

d. En Berlín, alrededor de 1 de cada 1000 personas muestran una anomalía de los leucocitos muy similar a la descrita para los conejos. La anomalía se hereda de una manera dominante simple, pero en este caso no se ha observado el tipo homocigótico. ¿Puede sugerir por qué, permitiéndose la analogía con el caso de los conejos?

e. De nuevo por analogía con los conejos, ¿qué situación genética sería de esperar entre los hijos de un varón y una mujer, ambos con la anomalía de Pelger?

(El problema 9 se ha tomado de A.M. Srb, R.D. Owen y R.S. Edgar, *General Genetics*, 2.ª ed. W.H. Freeman and Company, 1965.)

10. Se han cruzado dos moscas del vinagre de aspecto normal y en la descendencia aparecen 202 hembras y 98 machos.

a. ¿Qué resulta anómalo en estos datos?

b. Ofrezca una explicación de esa anomalía.

c. Indique una forma de someter a prueba su hipótesis.

11. Ha recibido una hembra virgen de *Drosophila* y observa que las cerdas de su tórax son más cortas de lo normal. La cruza con un macho normal (de cerdas largas) y obtiene la siguiente descendencia F_1: $\frac{1}{3}$ son hembras de cerdas cortas, $\frac{1}{3}$ son hembras de cerdas largas y $\frac{1}{3}$ machos de cerdas largas. Un cruzamiento entre hembras F_1 de cerdas largas y sus hermanos produce una F_2 exclusivamente de cerdas largas. Un cruzamiento entre hembras F_1 de cerdas cortas y sus hermanos produce $\frac{1}{3}$ de hembras de cerdas cortas, $\frac{1}{3}$ de hembras de cerdas largas y $\frac{1}{3}$ de machos de cerdas largas. Ofrezca una explicación genética que dé cuenta de todos estos resultados, indicando los genotipos de cada cruzamiento.

12. En *Drosophila*, el alelo dominante *H* reduce el número de cerdas corporales, produciendo el fenotipo «sin cerdas». *H* es letal en homocigosis. El alelo *S* de un gen independiente dominante y no tiene efecto sobre el número de cerdas, excepto en presencia de *H*, en cuyo caso una única dosis de *S* suprime el fenotipo «sin cerdas» y restablece la condición normal. Sin embargo, *S* es también letal en homocigosis (*S/S*).

a. ¿Qué proporción de individuos con cerdas a individuos sin cerdas encontraría en la descendencia viable de un cruzamiento entre dos moscas con cerdas, portadoras ambas del alelo *H* en su condición suprimida?

b. Si la descendencia sin cerdas de la cuestión anterior se cruza de nuevo con una mosca parental, ¿qué proporciones fenotípicas esperaría en la descendencia viable?

13. Una línea pura de calabacín que produce frutos en forma de disco se cruza con una línea pura que produce frutos alargados. La F_1 desarrolla frutos en forma de disco, pero en la F_2 aparece un fenotipo nuevo, fruto esférico. Los datos de la F_2 son los que siguen:

disco	270
esférico	178
alargado	32

Proponga una explicación para estos resultados y muestre los genotipos de las generaciones P, F_1 y F_2. (Figura de P. J. Russell, *Genetics*, 3ª. ed., Harper-Collins, 1992.)



14. La planta *Antirrhinum* produce el pigmento antocianina y por ello sus pétalos son de color violeta rojizo. Se han obtenido dos líneas puras de *Antirrhinum* que no producen ese pigmento, una en California y la otra en Holanda. Parecen idénticas en cuanto a que carecen completamente del pigmento y, por tanto, sus flores son blancas (fenotipo albino). Sin embargo, si se mezclan extractos de pétalos de ambas líneas en un mismo tubo de ensayo, la muestra incolora al principio, se vuelve gradualmente de color rojo.

a. ¿Qué experimento debe realizarse como control antes de seguir con otros análisis?

b. ¿Cómo podría explicar la producción de pigmento rojo en el tubo de ensayo?

c. De acuerdo con su respuesta a la pregunta b, ¿cuáles serán los genotipos de las dos líneas puras?

d. Si cruzáramos las dos líneas puras, ¿cómo esperaría que fueran los fenotipos de la F_1 y la F_2?

15. El gallo «ensortijado» es muy admirado por los aficionados a las aves. Recibe ese nombre por la forma peculiar en que se curvan sus plumas, que dan la impresión (en las memorables palabras del genético animal F. B. Hutt) de «haber sido rizadas, pasándolas por un agujero hecho en un trozo de madera». Desgraciadamente, el gallo ensortijado no es una línea pura: al cruzar un macho y una hembra de ese fenotipo, siempre aparecen un 50 % de individuos ensortijados, un 25 % de individuos normales y un 25 % de individuos con plumas de un aspecto lanudo peculiar que pronto se pierden, dejando al ave desnuda.

a. Ofrezca una explicación genética a estos resultados, indicando los genotipos de todos los fenotipos citados e indicando cómo funciona su hipótesis.

b. Si quisiera producir gallos ensortijados en grandes cantidades, ¿qué progenitores serían los mejores?

16. El síndrome de Marfan es una enfermedad del tejido conjuntivo fibroso que se caracteriza por muchos síntomas, incluyendo dedos largos y finos, ojos defectuosos, cardiopatías y extremidades largas. (Flo Hyman, famosa estrella norteamericana de *voleyball* sufría de síndrome de Marfan y murió justo después de un partido a causa de una rotura de la aorta.)

a. Use el pedigrí de la figura adjunta para proponer el modo de herencia del síndrome de Marfan.

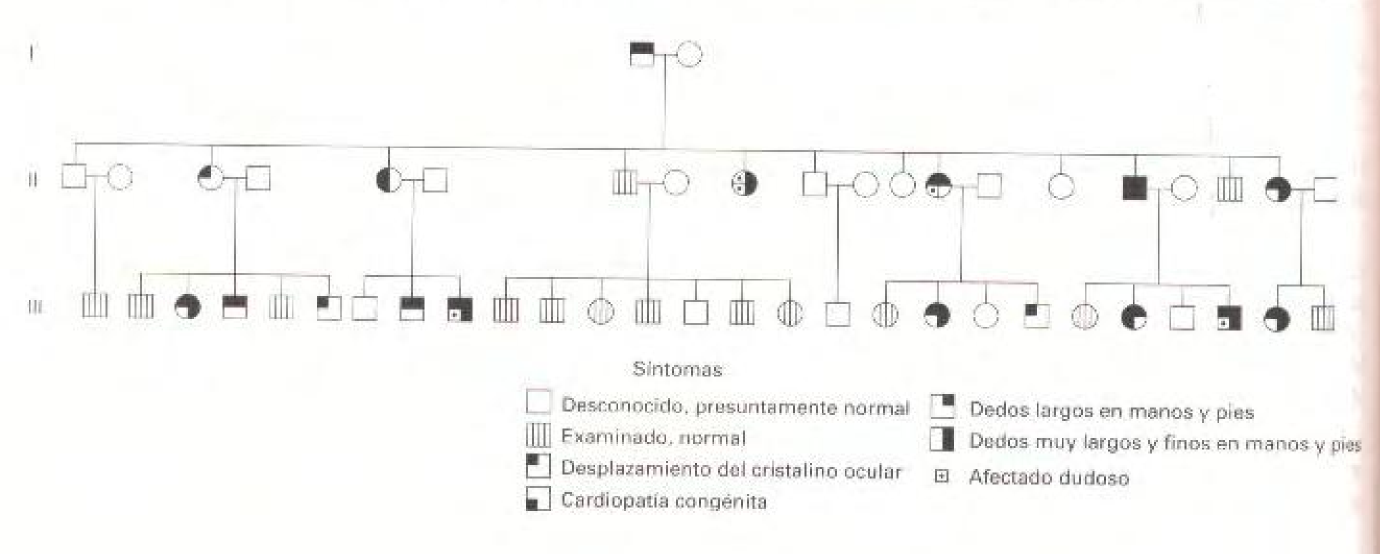
b. ¿Qué fenómeno genético ilustra este pedigrí?

c. Especule sobre las posibles causas de ese fenómeno.

(Figura de J. V. Neel y W. J. Schull, *Human Heredity*. University of Chicago Press, 1954.)

17. Los pétalos de la planta *Collinsia parviflora* son normalmente azules, dándole a la especie su nombre común en inglés, *blue-eyed Mary* (Mary ojos azules). Se obtuvieron dos líneas puras a partir de variaciones del color encontradas en la naturaleza. La primera línea tenía pétalos rosa y la segunda pétalos blancos. Se realizaron los cruzamientos entre las líneas puras que a continuación se muestran, con los resultados siguientes:

Parentales	F_1	F_2
azul × blanco	azul	101 azul, 33 blanco
azul × rosa	azul	192 azul, 63 rosa
rosa × blanco	azul	272 azul, 121 blanco, 89 rosa



a. Ofrezca una explicación genética para estos resultados. Defina los símbolos alélicos que utilice y muestre la constitución genética de los parentales, la F_1 y la F_2.

b. Un cruzamiento entre cierta planta F_2 azul y cierta planta F_2 blanca generó una descendencia en la que $\frac{3}{8}$ eran de color azul, $\frac{1}{8}$ de color rosa y $\frac{1}{2}$ de color blanco. ¿Cuáles deben ser los genotipos de estas dos plantas?

El problema paso a paso

1. ¿Cuál es el carácter a estudio?
2. ¿Qué es el fenotipo silvestre?
3. ¿Qué es una variante?
4. ¿Cuáles son las variantes en este problema?
5. ¿Qué significa «en la naturaleza»?
6. ¿De qué manera se han encontrado las variantes en la naturaleza? (Describa la escena).
7. ¿En qué etapas de los experimentos se usarían las semillas?
8. ¿Significaría lo mismo describir un cruzamiento como «azul × blanco» (por ejemplo) que «blanco × azul»? ¿Esperaría los mismos resultados? ¿Por qué sí o por qué no?
9. ¿En qué difieren las dos primeras filas de la tabla de la tercera?
10. ¿Qué fenotipos son dominantes?
11. ¿Qué es la complementación?
12. ¿De dónde surge el color azul en el cruzamiento rosa × blanco?
13. ¿Qué fenómeno genético representa la producción de una F_1 azul a partir de parentales de color blanco y rosa?
14. Realice una lista de cualquier proporción que pueda apreciar.
15. ¿Hay proporciones monohíbridas?
16. ¿Hay proporciones dihíbridas?
17. ¿Qué le indica la observación de proporciones monohíbridas y dihíbridas?
18. Enumere cuatro modificaciones de las proporciones mendelianas que pueda recordar.
19. ¿Se encuentra representada en el problema alguna de esas desviaciones de las proporciones mendelianas?
20. ¿Qué indican normalmente las desviaciones de las proporciones mendelianas?
21. ¿Qué indica la desviación (o desviaciones) de las proporciones mendelianas representada en el problema?
22. Dibuje con cromosomas un esquema representando las meiosis de los parentales en el cruzamiento blanco × azul, y la meiosis en la F_1 de dicho cruzamiento.
23. Repita el punto 22 para el cruzamiento azul × rosa.

***18.** En la planta del guisante (*Pisum sativum*), la presencia del compuesto pisatina se asocia con la defensa frente a los hongos parásitos. Las plantas normales contienen pisatina y son resistentes a los hongos. Se obtuvieron dos líneas puras, ambas carentes de pisatina y, por tanto, muy susceptibles a la infección por hongos. La línea 1 procedía de California y la línea 2 de Suecia. Se estudiaron ambas líneas del modo que se muestra a continuación (**Nota:** las líneas normales también eran líneas puras):

Cruzamiento	Fenotipos F_1	Fenotipos F_2
línea 1 × normal	pisatina	$\frac{3}{4}$ pisatina $\frac{1}{4}$ sin pisatina
línea 2 × normal	sin pisatina	$\frac{3}{4}$ sin pisatina $\frac{1}{4}$ pisatina
línea 1 × línea 2	sin pisatina	$\frac{13}{16}$ sin pisatina $\frac{3}{16}$ pisatina

a. Proponga un modelo que explique los resultados de estos cruzamientos. Asegúrese de que define de forma precisa los símbolos alélicos que utiliza.

b. Muestre los fenotipos de los parentales, F_1 y F_2 de cada cruzamiento.

c. ¿En qué difieren, desde el punto de vista genético, las líneas 1 y 2 respecto a su carencia de pisatina?

19. Una mujer poseía un caniche hembra de raza pura que era albina (un fenotipo autosómico recesivo) y quería cruzarla para obtener una camada de cachorros blancos. Llevó el perro a un criador, que le dijo que cruzaría a la hembra con un semental macho albino, también de raza pura. Cuando nacieron 6 cachorros, todos eran negros, por lo que la mujer denunció al criador, quejándose de que había cambiado al semental macho por un perro negro, proporcionándole una camada que no era la deseada. Imagine que le llaman como testigo experto, y la defensa le pregunta si es posible que aparezcan descendientes negros a partir de dos padres albinos de raza pura. ¿Cómo testificaría?

20. Una planta de la especie *Antirrhinum*, homocigótica para el color blanco de los pétalos, se cruza con otra planta homocigótica de pétalos de color violeta. Todos los individuos de la F_1 tienen pétalos blancos. Se autofecunda la F_1 y aparecen tres fenotipos distintos en la F_2, en la que se obtienen los resultados siguientes:

blanco	240
violeta liso	61
violeta moteado	19
Total	320

a. Ofrezca una explicación de estos resultados, indicando los genotipos de todas las generaciones (invente y explique sus propios símbolos).

b. Se cruza una planta F_2 blanca con otra planta F_2 de color violeta liso, obteniéndose la siguiente descendencia:

blanco	50 %
violeta liso	25 %
violeta moteado	25 %

¿Cuáles eran los genotipos de las dos plantas F_2 que se cruzaron?

21. La mayoría de los escarabajos de la harina son negros, pero se conocen diversas variantes de color. Se han hecho varios cruzamientos entre distintas líneas puras para producir la F_1, y el cruzamiento entre sí de los individuos de cada F_1 ha producido las proporciones indicadas a continuación. Los fenotipos se han abreviado así: N, negro; M, marrón; A, amarillo, y B, blanco.

Cruzamientos	Progenitores	F_1	F_2
1	M × A	M	3 M : 1 A
2	N × M	N	3 N : 1 M
3	N × A	N	3 N : 1 A
4	B × A	N	9 N : 3 A : 4 B
5	B × M	N	9 N : 3 M : 4 B
6	N × B	N	9 N : 3 A : 4 B

a. A partir de estos resultados, averigüe y explique el modo de herencia de estos colores.

b. Escriba los genotipos de los progenitores, la F_1 y la F_2 de cada cruzamiento.

22. Se casan dos individuos albinos y tienen cuatro hijos normales. ¿Cómo es esto posible?

***23.** Se han obtenido tres líneas puras independientes de plantas de flores blancas de una especie de *Petunia*; y se realizan los cruzamientos siguientes:

Cruzamiento	Parentales	Descendientes
1	línea 1 × línea 2	F_1 todas blancas
2	línea 1 × línea 3	F_1 todas rojas
3	línea 2 × línea 3	F_1 todas blancas
4	roja F_1 × línea 1	$\frac{1}{4}$ rojas : $\frac{3}{4}$ blancas
5	roja F_1 × línea 2	$\frac{1}{8}$ rojas : $\frac{7}{8}$ blancas
6	roja F_1 × línea 3	$\frac{1}{2}$ rojas : $\frac{1}{2}$ blancas

a. Explique estos resultados, empleando símbolos genéticos de su propia cosecha.

b. Si una planta de flores rojas de la F_1 del cruzamiento 2 se cruza con una de flores blancas del cruzamiento 3, ¿qué proporción de la descendencia tendrá flores rojas?

24. En la planta japonesa «gloria de la mañana» (*Pharbitis nil*), pueden aparecer flores púrpura por la presencia de alelos dominantes de cualquiera de dos genes distintos ($A/- \cdot b/b$ o $a/a \cdot B/-$). $A/- \cdot B/-$ produce pétalos azules y $a/a \cdot b/b$, pétalos escarlata. Deduzca los genotipos parentales y la descendencia de los cruzamientos siguientes:

Cruzamiento	Parentales	Descendientes
1	azul × escarlata	$\frac{1}{4}$ azules : $\frac{1}{2}$ púrpuras : $\frac{1}{4}$ escarlatas
2	púrpura × púrpura	$\frac{1}{4}$ azules : $\frac{1}{2}$ púrpuras : $\frac{1}{4}$ escarlatas
3	azul × azul	$\frac{3}{4}$ azules : $\frac{1}{4}$ púrpuras
4	azul × púrpura	$\frac{3}{8}$ azules : $\frac{4}{8}$ púrpuras : $\frac{1}{8}$ escarlatas
5	púrpura × escarlata	$\frac{1}{2}$ púrpuras : $\frac{1}{2}$ escarlatas

25. Los criadores de maíz han obtenido líneas puras cuyas mazorcas, expuestas al sol, se tornan de color rojo brillante, rosa, escarlata o naranja (las mazorcas normales permanecen de color amarillo si se exponen al sol). Algunos cruzamientos entre estas líneas produjeron los resultados que se indican. Los fenotipos se han abreviado así: N, naranja; R, rosa; E, escarlata; RB, rojo brillante, y A, amarillo.

	FENOTIPOS		
Cruzamientos	Parental	F_1	F_2
1	RB × R	todos RB	66 RB : 20 R
2	N × RB	todos RB	998 RB : 314 N
3	N × R	todos N	1300 N : 429 R
4	N × E	todos A	182 A : 80 N : 58 E

Analice los resultados de cada cruzamiento y ofrezca una hipótesis unitaria que dé cuenta de *todos* los resultados. (Explique todos los símbolos que utilice).

26. Muchos animales silvestres muestran el patrón de color agutí, en el que cada pelo tiene una banda amarilla (véase la Fig. 4-18).

a. En los ratones y otros animales negros la banda amarilla está ausente del pelo que es totalmente negro. Esta ausencia del patrón silvestre agutí se denomina *no agutí*. Cuando se cruza una línea pura agutí de ratón con una no agutí, la F_1 es toda ella agutí y en la F_2 aparece una proporción de 3:1 de agutí a no agutí. Haga un diagrama de este cruzamiento siendo A = agutí y a = no agutí. Indique los genotipos y los fenotipos de los parentales, sus gametos, la F_1, sus gametos y la F_2.

b. En otra variación heredable del color de los ratones, el marrón sustituye al negro del silvestre. Tales ratones agutí marrones se llaman *canelos*. Si cruzamos ratones silvestres con canelos, la F_1 es silvestre y en la F_2 se produce una proporción 3:1 de silvestres a canelos. Haga un diagrama de este cruzamiento, siendo B = negro silvestre y b = marrón canela.

c. Si se cruzan líneas puras de ratones canelos y no agutí (negro), La F_1 es toda silvestre. Haga un diagrama genético para explicar este resultado.

d. En la F_2 del cruzamiento descrito en c, además de los colores parentales canela y no agutí y del color silvestre de la F_1, aparece un cuarto color, llamado chocolate. Los rato-

nes de este tipo muestran un color marrón oscuro denso. ¿Cuál es la constitución genética de los ratones chocolate?

e. Suponiendo que las parejas alélicas *A/a* y *B/b* segregan independientemente una de otra, ¿cuál sería la frecuencia relativa esperada para cada tipo de color en la F_2 descrita en d? Haga un diagrama de las partes c y d del cruzamiento que muestre los genotipos y fenotipos (incluyendo los gametos).

f. ¿Qué fenotipos se esperan y en qué proporciones, si se cruzan los ratones F_1 descritos en c con la línea parental canela? ¿Y con la línea parental no agutí (negro)? Haga un diagrama de estos cruzamientos.

g. Diseñe un cruzamiento de prueba para la F_1 descrita en c. ¿Qué colores resultarían y en qué proporciones?

h. Los ratones albinos (blancos, de ojos rosa) son homocigóticos para el alelo recesivo de una pareja alélica, *C/c*, que segrega independientemente de las parejas *A/a* y *B/b*. Tiene cuatro líneas albinas autofecundadas muchas veces (y, por tanto, presumiblemente homocigóticas). Cruza cada una de estas líneas con una línea pura silvestre y obtiene una F_2 numerosa de cada cruzamiento. A partir de los fenotipos F_2 que se muestran en la tabla, ¿qué genotipos asignaría a las cuatro líneas de albinos?

FENOTIPOS DE F_2

Línea	Silvestre	Negro	Canela	Chocolate	Albino
1	87	0	32	0	39
2	62	0	0	0	18
3	96	30	0	0	41
4	287	86	92	29	164

(El problema 26 está adaptado de A.M. Srb, R.D. Owen y R.S. Edgar, *General Genetics*, 2d. ed. W.H. Freeman and Company, 1965.)

27. El color amarillo de las ratas está determinado por un alelo *A*, que no es letal en homocigosis. En un gen distinto, que segrega independientemente, el alelo *R* produce color negro. Juntos, *A* y *R*, producen un color gris, mientras *a* y *r* producen color blanco. Un macho gris se cruza con una hembra amarilla y la F_1 es $\frac{3}{8}$ amarilla, $\frac{3}{8}$ gris, $\frac{1}{8}$ negra y $\frac{1}{8}$ blanca. Determine el genotipo de los parentales.

28. En el gallo, el genotipo *r/r* ; *p/p* produce cresta sencilla, *R/–* ; *P/–* produce cresta en forma de nuez, *r/r* ; *P/–* en forma de guisante, y *R/–* ; *p/p* en forma de rosa.

a. ¿Qué tipos de crestas aparecerán en la F_1 y F_2 y en qué proporciones, si se cruzan aves de cresta sencilla con una línea pura de aves de cresta tipo nuez?

b. ¿Cuáles son los genotipos parentales de un cruzamiento nuez × rosa, cuya descendencia fue $\frac{3}{8}$ crestas rosas, $\frac{3}{8}$ crestas tipo nuez, $\frac{1}{8}$ crestas tipo guisante y $\frac{1}{8}$ sencillas?

c. ¿Cuáles son los genotipos parentales de un cruzamiento nuez × rosa, cuya descendencia fue toda ella de tipo nuez?

d. ¿Cuántos y qué genotipos producirán fenotipo nuez?



29. El alelo dominante *A* es necesario para la producción del pigmento rojo del ojo de *Drosophila*. El alelo dominante *P* de otro gen distinto hace que el pigmento sea de color púrpura, mientras que su alelo recesivo mantiene el color rojo del pigmento. Una mosca que no produce pigmento alguno tiene los ojos blancos. Se han cruzado dos líneas puras, con los resultados siguientes:

P hembra de ojos rojos × macho de ojos blancos

↓

F_1 hembras de ojos púrpuras
machos de ojos rojos
F_1 × F1

↓

F_2 tanto machos como hembras: $\frac{3}{8}$ ojos púrpura
$\frac{3}{8}$ ojos rojos
$\frac{2}{8}$ ojos blancos

Explique este modo de herencia, indicando el genotipo de los parentales, la F_1 y la F_2.

30. En el cruzamiento de una línea pura de perros de color marrón con otra línea pura concreta, todos los cachorros de la F_1 fueron blancos. La descendencia F_2 de varios cruzamientos F_1 × F_1 estaba compuesta, en conjunto, por 118 cachorros blancos, 32 negros y 10 marrones. ¿Cuál es la base genética de estos resultados?

31. Tres alelos dominantes, llamados *A*, *C* y *R*, deben estar presentes en el maíz para que se produzcan semillas coloreadas. Los genotipos *A/–* ; *C/–* ; *R/–* son coloreados; todos los demás son incoloros. Una planta coloreada se cruza con tres plantas de prueba, de genotipo conocido. Con la planta de prueba *a/a* ; *c/c* ; *R/R*, la planta coloreada produce un 50 % de semillas coloreadas; con la planta *a/a* ; *C/C* ; *r/r*, produce un 25 % de semillas coloreadas, y con *A/A* ; *c/c* ; *r/r*, produce un 50 % de semillas coloreadas. ¿Cuál es el genotipo de la planta coloreada?

32. Como se indica en el problema 31, la aparición de pigmento en la cubierta externa de las semillas de maíz requiere que cada uno de tres genes que segregan de forma independiente, *A*, *C* y *R*, estén representados por al menos un alelo dominante. El alelo dominante *Pr* de un cuarto gen independiente es necesario para convertir un precursor bioquí-

mico en un pigmento púrpura, y su alelo recesivo *pr* hace que el pigmento sea de color rojo. Las semillas de las plantas que no producen pigmento son de color amarillo. Considere el cruzamiento entre una variedad de genotipo *A/A* ; *C/C* ; *R/R* ; *pr/pr* y otra de genotipo *a/a* ; *c/c* ; *r/r* ; *Pr/Pr*.

a. ¿Cuáles son los fenotipos de las dos variedades parentales?

b. ¿Cuál será el fenotipo de la F_1?

c. ¿Qué fenotipos y en qué proporciones aparecerán en la descendencia de la autofecundación de la F_1?

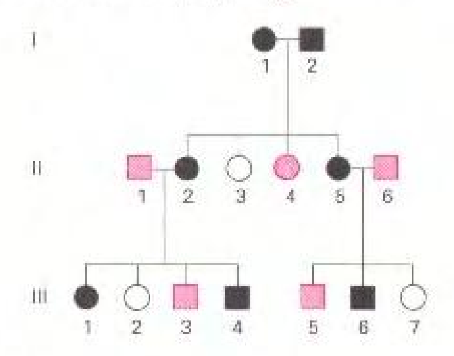
d. ¿Qué proporciones espera en la descendencia de un cruzamiento de prueba con la F_1?

33. Las estirpes silvestres del hongo haploide *Neurospora* pueden fabricar su propio triptófano. Un alelo anormal, *td*, hace al hongo incapaz de fabricar triptófano. Un individuo de genotipo *td* crece sólo si se añade triptófano al medio de cultivo. El alelo *su* segrega de forma independiente del alelo *td*, su único efecto conocido es suprimir el fenotipo debido a *td*. Por tanto, las estirpes que llevan tanto *td* como *su* no requieren la presencia de triptófano en el medio para crecer.

a. Si se cruza una estirpe *td* ; *su* con una estirpe genotípicamente silvestre, ¿qué genotipos se esperan entre los descendientes y en qué proporciones?

b. ¿Cuál será la proporción entre descendientes dependientes de triptófano y no dependientes de triptófano en el cruzamiento del apartado a?

34. El alelo *B* da a los ratones su color negro y *b* su color marrón. El genotipo *e/e*, de otro gen que segrega independientemente, impide la expresión de *B* y *b*, y hace que el color del pelaje sea beige, mientras que el genotipo *E/–* permite la expresión de *B* y *b*. Ambos genes son autosómicos. En el pedigrí adjunto, los símbolos en negro indican pelaje de color negro, los símbolos en rosa pelaje marrón y los símbolos en blanco pelaje beige.



a. ¿Qué nombre recibe el tipo de interacción génica que aparece en este caso?

b. ¿Cuáles son los genotipos de los individuos del pedigrí? (Si en algún caso hay más de una alternativa, indíquelas.)

35. Se cruzan ratones de genotipo *A/A* ; *B/B* ; *C/C* ; *D/D* ; *S/S* con otros de genotipo *a/a* ; *b/b* ; *c/c* ; *d/d* ; *s/s*. (Estos símbolos génicos se explican en el texto de este capítulo). Los descendientes se cruzan entre sí. ¿Qué fenotipos aparecerán en la F_2 y en qué proporciones?

36. Considere los siguientes genotipos de dos líneas de pollo: la línea pura Mottled Hondan es *i/i* ; *D/D* ; *M/M* ; *W/W*, y la línea pura Leghorn *I/I* ; *d/d* ; *m/m* ; *w/w*, siendo

I = plumas blancas, *i* = plumas de color
D = cresta doble, *d* = cresta sencilla
M = con papada, *m* = sin papada
W = piel blanca, *w* = piel amarilla

Los cuatro genes segregan de forma independiente. Empezando con estas dos líneas puras, ¿cuál es la manera más rápida y conveniente de generar una línea pura de aves con plumas de color, cresta sencilla, piel amarilla y sin papada? Asegúrese que indica:

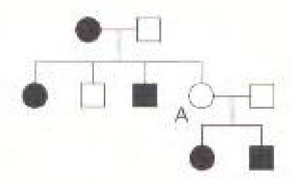
a. Todos los cruzamientos a realizar.

b. El genotipo de cada animal utilizado.

c. El número de huevos que debe incubar de cada cruzamiento y la razón de ese número.

d. Por qué su esquema de cruzamientos es el más rápido y conveniente.

37. El pedigrí adjunto corresponde a un fenotipo dominante gobernado por un gen autosómico. ¿Qué sugiere este pedigrí sobre dicho fenotipo y qué puede deducir sobre el genotipo de la mujer A?



38. La determinación genética del color del pétalo de la dedalera se explica en la Figura 4-17. Considere los dos cruzamientos siguientes:

Cruzamiento	Parentales	Descendientes
1	violeta oscuro × blanco con manchas amarillas	$\frac{1}{2}$ violeta oscuro; $\frac{1}{2}$ violeta claro
2	blanco con manchas amarillas × violeta claro	$\frac{1}{2}$ blanco con manchas amarillas; $\frac{1}{4}$ violeta oscuro; $\frac{1}{4}$ violeta claro

Indique los genotipos de los parentales y de los descendientes de cada cruzamiento, con respecto a los tres genes indicados.

39. Un investigador cruza dos líneas de flores blancas de la planta *Antirrhinum* y obtiene los resultados siguientes:

línea pura 1 × línea pura 2

↓

F_1 todas blancas

$F_1 \times F_1$

↓

F_2 131 blancas

29 rojas

a. Averigüe el modo de herencia de estos fenotipos, empleando símbolos definidos con claridad. Indique el fenotipo de los parentales, la F_1 y la F_2.

b. Prediga el resultado del cruzamiento de la F_1 con cada una de las líneas parentales.

40. Suponga que el color púrpura normal de los pétalos de petunia se debe a la mezcla de dos pigmentos, uno rojo y otro azul. Como se muestra en las dos líneas superiores del diagrama adjunto, cada pigmento se sintetiza mediante una ruta metabólica distinta. «Blanco» significa un compuesto no coloreado (la carencia total de pigmento da lugar a pétalos blancos). El pigmento rojo se forma a partir de un compuesto intermedio de color amarillo, cuya concentración normal es demasiado baja para dar color a los pétalos.

Una tercera ruta metabólica, cuyos compuestos no contribuyen a la coloración de los pétalos, no afecta normalmente a la formación de los pigmentos rojo y azul, pero si uno de sus intermediarios ($blanco_3$) alcanza una concentración alta, es convertido en el compuesto intermedio amarillo de la ruta del pigmento rojo.

Las letras A-E del diagrama representan enzimas; los genes correspondientes, ninguno de los cuales está ligado, pueden representarse con las mismas letras.

ruta I ····→ $blanco_1 \xrightarrow{E}$ azul

ruta II ····→ $blanco_2 \xrightarrow{A}$ amarillo $\xrightarrow{B}$ rojo

C↑

ruta III ····→ $blanco_3 \xrightarrow{D}$ $blanco_4$

Suponga que los alelos silvestres son dominantes y determinan enzimas activas, mientras que los alelos recesivos determinan falta de actividad enzimática. Averigüe qué genotipos parentales de líneas puras deben cruzarse para que en la F_2 aparezcan las proporciones fenotípicas siguientes:

a. 9 púrpura : 3 verde : 4 azul.

b. 9 púrpura : 3 rojo : 3 azul : 1 blanco.

c. 13 púrpura : 3 azul.

d. 9 púrpura : 3 rojo : 3 verde : 1 amarillo.

(Nota: el azul mezclado con el amarillo da verde; suponga que ninguna mutación es letal.)

41. Las flores de la planta «capuchina» (*Tropaeolum majus*) pueden ser sencillas (S), dobles (D) o «super-dobles» (Sd). Las super-dobles son flores femeninas estériles, aparecidas a partir de una variedad de flores dobles. Varios cruzamientos entre variedades han producido los descendientes que se indican en la tabla siguiente, en la que *pura* significa que la línea es homocigótica.

Cruzamiento	Parentales	Descendientes
1	S pura × D pura	Todas S
2	F_1 del cruzamiento 1 × F_1 del cruzamiento 1	78 S : 27 D
3	D pura × Sd	112 Sd : 108 D
4	S pura × Sd	8 Sd : 7S
5	D pura × descendiente Sd del cruzamiento 4	18 Sd : 19 S
6	D pura × descendiente S del cruzamiento 4	14 D : 16 S

Empleando sus propios símbolos genéticos, proponga una explicación de los resultados, indicando

a. los genotipos de todos los individuos que aparecen en cada una de las seis líneas de la tabla.

b. el origen propuesto para la variedad super-doble.

*42. En cierta especie de mosca, el color normal de los ojos es rojo (R). Se han encontrado cuatro fenotipos anormales de color de ojos: dos eran amarillos (A1 y A2), uno era marrón (M) y otro era naranja (N). Se obtuvo una línea pura de cada fenotipo y se cruzaron en todas las combinaciones posibles. Las moscas F_1 de cada cruzamiento se cruzaron entre sí para obtener la F_2. Las distintas F_1 y F_2 se muestran en el cuadro adjunto; las líneas puras se indican en los márgenes.

		A1	A2	M	N
A_1	F_1	todas a	todas r	todas r	todas r
	F_2	todas a	9 r 7 a	9 r 4 a 3 m	9 r 4 n 3 a
A_2	F_1		todas a	todas r	todas r
	F_2		todas a	9 r 4 a 3 m	9 r 4 a 3 n
M	F_1			todas m	todas r
	F_2			todas m	9 r 4 n 3 m
N	F_1				todas n
	F_2				todas n

a. Defina sus propios símbolos e indique los genotipos de las cuatro líneas puras.

b. Indique cómo se producen los fenotipos de la F_1 y las proporciones fenotípicas de la F_2.

c. Si comprende qué es una ruta metabólica, proponga una que explique los resultados genéticos, señalando qué gen determina cada enzima.

43. El color de los granos del trigo común, *Triticum aestivum*, está determinado por múltiples genes duplicados, cada uno con un alelo *R* y un alelo *r*. La presencia de

cualquier número de alelos *R* produce fenotipo rojo y la ausencia completa de alelos *R* fenotipo blanco. La F_2 de un cruzamiento entre una línea pura roja y una línea pura blanca estaba compuesta por $\frac{63}{64}$ descendientes rojos y $\frac{1}{64}$ blancos.

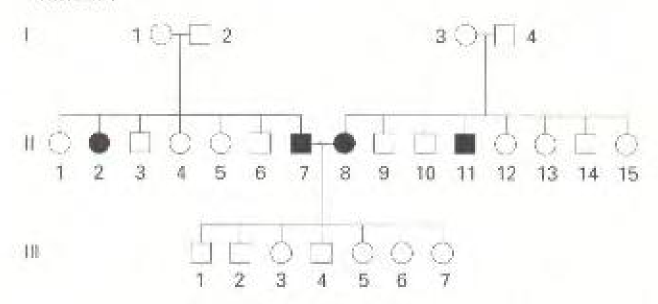
a. ¿Cuántos genes *R* están segregando en este cruzamiento?

b. Indique los genotipos de los parentales, la F_1 y la F_2.

c. Se utilizan distintas plantas F_2 en cruzamientos de prueba con el parental blanco. Indique ejemplos de genotipos que en el cruzamiento de prueba producirían descendientes en las siguientes proporciones fenotípicas: (1) 1 rojo : 1 blanco, (2) 3 rojos : 1 blanco, (3) 7 rojos : 1 blanco.

***d.** En sistemas como éstos, ¿cuál es la fórmula general que relaciona el número de genes que están segregando con la proporción de individuos rojos de la F_2?

44. El pedigrí adjunto muestra la herencia del carácter «sordomudo».



a. Proponga una explicación del modo de herencia de este carácter raro en las generaciones I y II de cada una de las familias, indicando el genotipo del mayor número posible de individuos. Utilice sus propios símbolos.

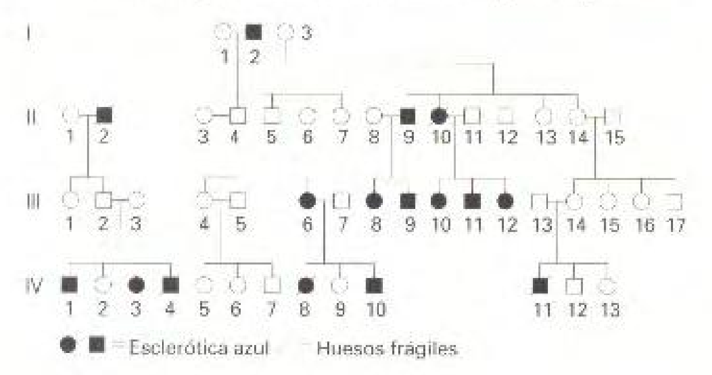
b. Ofrezca una explicación al hecho de que todos los individuos de la generación III sean normales, asegurándose de que es compatible con su respuesta anterior.

45. El pedigrí adjunto se refiere a los caracteres «esclerótica azul» (presencia de una fina película azulada que cubre el ojo) y «hueso frágil»:

a. ¿Se deben estas dos anomalías al mismo gen?

b. El gen (o genes), ¿es autosómico o ligado al sexo?

c. ¿Ofrece el pedigrí alguna prueba de penetrancia incompleta o expresividad variable? Si es así, calcule los valores correspondientes de la forma más precisa posible.



46. Las abejas obreras de la línea conocida como Brown (marrón en inglés, pero que no alude al fenotipo de las abejas) muestran un comportamiento conocido como «higiénico». Esto es, las obreras destapan los compartimientos que contienen pupas muertas y las retiran de la colmena. Ello sirve para impedir la expansión de bacterias infecciosas por toda la colonia. Las obreras de la línea de abejas *Van Scoy* no llevan a cabo ese trabajo y, por tanto, se dice de ellas que son «antihigiénicas». Al cruzar una abeja reina de la línea *Brown* con zánganos de la línea *Van Scoy*, la F_1 fue antihigiénica. Zánganos de la F_1 se utilizaron para inseminar una reina de la línea *Brown* y el comportamiento de los descendientes fue como sigue:

$\frac{1}{4}$ eran higiénicos
$\frac{1}{4}$ habrían los compartimientos, pero no retiraban las pupas
$\frac{1}{2}$ eran antihigiénicos

No obstante, al estudiar los individuos antihigiénicos con más detalle, se observó que si se destapaban manualmente los compartimientos de las pupas muertas, alrededor de la mitad de dichos individuos retiraban las pupas, en tanto que la otra mitad no lo hacía.

a. Proponga una hipótesis genética para explicar estos patrones de comportamiento.

b. Discuta los datos en términos de epistasia, dominancia e interacciones ambientales.

(**Nota:** las abejas obreras son estériles y todas las abejas de una misma línea tienen los mismos alelos.)

47. En cierta especie de *Drosophila*, las alas normales presentan una forma redondeada, pero se han obtenido dos líneas puras, una de las cuales presenta alas ovaladas y la otra alas con forma de hoz. Los cruzamientos entre las diferentes estirpes arrojan los resultados que se muestran:

PARENTALES		F_1	
Hembras	Macho	Hembras	Macho
hoz	redondeado	hoz	hoz
redondeado	hoz	hoz	redondeado
hoz	ovalado	ovalado	hoz

a. Proponga una hipótesis genética que explique estos resultados, definiendo todos los símbolos alélicos.

b. Si las hembras de fenotipo ovalado de la F_1 del cruzamiento 3 se cruzasen con los machos de fenotipo redondeado de la F_1 del cruzamiento 2, ¿qué proporciones fenotípicas cabría esperar en cada sexo de la descendencia?

48. Los ratones muestran normalmente una sola banda amarilla en sus pelos, pero existen variantes donde aparecen dos o tres bandas. Una hembra de una estirpe normal de una banda se cruzó con un macho de tres bandas (ninguno de

los animales pertenecía a una línea pura). La descendencia fue:

Hembras	$\frac{1}{2}$ una banda
	$\frac{1}{2}$ tres bandas
Machos	$\frac{1}{2}$ una banda
	$\frac{1}{2}$ dos bandas

a. Proporcione una explicación del modo de herencia y de los fenotipos que aparecen.

b. Según su modelo, ¿cuáles serían los resultados de un cruzamiento entre una hembra de tres bandas y un macho de una banda, siendo ambos hermanos procedentes del cruzamiento previo?

49. En los visones, el tipo silvestre tiene un pelaje casi negro. Los criadores han desarrollado muchas líneas puras de variantes de color para la industria peletera. Dos líneas puras de este tipo son las de color platino (gris azulado) y diamante (gris metálico). Estas líneas se utilizaron para realizar cruzamientos, con los siguientes resultados:

Cruzamiento	Parentales	F_1	F_2
1	silvestre × platino	silvestre	18 silvestres, 5 platino
2	silvestre × diamante	silvestre	27 silvestres, 10 diamante
3	platino × diamante	silvestre	133 silvestres, 41 platino, 46 diamante, 17 zafiro (nuevo)

a. Proporcione una explicación genética para estos resultados. Muestre los genotipos de los parentales, F_1 y F_2 de los tres cruzamientos, asegurándose de que indica los alelos de cada gen en todos los individuos.

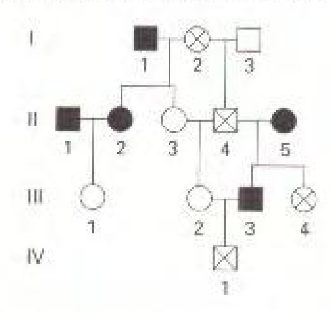
b. Prediga las proporciones fenotípicas de la F_1 y la F_2 de cruzamientos de líneas puras zafiro × platino y zafiro × diamante.

50. En *Drosophila*, un gen autosómico determina la forma de las quetas. El alelo *B* determina quetas rectas, mientras que el alelo *b* produce quetas curvadas. En otro autosoma, hay otro gen cuyo alelo dominante *I* inhibe la formación de quetas, de forma que la mosca carece por completo de ellas (el alelo *i* carece de efecto fenotípico).

a. Si se cruza una mosca de una línea pura de quetas rectas, con otra perteneciente a una línea pura sin quetas pero en la que se conoce que está inhibida la formación de quetas curvadas, ¿cuáles serán los genotipos y fenotipos en las generaciones F_1 y F_2?

b. ¿Qué cruzamiento daría una proporción 4 sin quetas : 3 rectas : 1 curvadas?

51. En el pedigrí adjunto se muestra la herencia del fenotipo ocular en los escarabajos del género *Tribolium*. Los símbolos negros representan ojos negros, los símbolos blancos representan ojos marrones, mientras que los símbolos señalados con una cruz corresponden a individuos sin ojos.



a. A partir de los datos, deduzca el modo de herencia de los tres fenotipos.

b. Utilizando símbolos alélicos bien definidos, muestre el genotipo del individuo II-3.

52. El color normal de los pétalos en el género *Antirrhinum* es rojo. Se han obtenido algunas líneas puras que muestran variaciones respecto al color de la flor. Cuando se cruzaron estas líneas puras, se observaron los siguientes resultados:

Parentales	F_1	F_2
1. naranja × amarillo	naranja	3 naranja : 1 amarillo
2. rojo × naranja	rojo	3 rojo : 1 naranja
3. rojo × amarillo	rojo	3 rojo : 1 amarillo
4. rojo × blanco	rojo	3 rojo : 1 blanco
5. amarillo × blanco	rojo	9 rojo : 3 amarillo : 4 blanco
6. naranja × blanco	rojo	9 rojo : 3 naranja : 4 blanco
7. rojo × blanco	rojo	9 rojo : 3 amarillo : 4 blanco

a. Explique el modo de herencia de estos colores.

b. Escriba los genotipos de los parentales, la F_1 y la F_2.

53. En cruzamientos efectuados en especies distintas se obtuvieron individuos en la generación F_1 con los fenotipos que se indican a continuación, así como las correspondientes F_2 generadas por autofecundación.

F_1	Proporciones fenotípicas en la F_2		
1. crema	$\frac{12}{16}$ crema	$\frac{3}{16}$ negro	$\frac{1}{16}$ gris
2. naranja	$\frac{9}{16}$ naranja	$\frac{7}{16}$ amarillo	
3. negro	$\frac{13}{16}$ negro	$\frac{3}{16}$ blanco	
4. rojo	$\frac{9}{16}$ rojo	$\frac{3}{16}$ rojo jaspeado	$\frac{4}{16}$ manchas rojas

Si las diferentes F_1 se retrocruzaran, ¿qué proporciones fenotípicas se observarían a partir de cada retrocruzamiento?

54. Ciertas mutaciones recesivas en el nematodo *Caenorhabditis elegans* ayudan a entender la base de su sistema de locomoción. Estas mutaciones hacen que el gusano se mueva de forma ineficaz con rápidas oscilaciones, en lugar de su manera habitual de desplazamiento mediante deslizamiento. Presumiblemente, estas mutaciones afectan a los sistemas nervioso y muscular. Se cruzaron entre sí doce mutantes homocigóticos y se examinó a los híbridos de la F_1 para comprobar si oscilaban. Los resultados se muestran a continuación. Un signo más significa que el híbrido

muestra fenotipo silvestre (deslizante), mientras que una «o» denota un fenotipo mutante oscilatorio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	o	+	+	+	o	+	+	+	+	+	+	+
2		o	+	+	+	o	+	o	+	o	+	+
3			o	o	+	+	+	+	+	+	+	+
4				o	+	+	+	+	+	+	+	+
5					o	+	+	+	+	+	+	+
6						o	+	o	+	o	+	+
7							o	+	+	+	o	o
8								o	+	o	+	+
9									o	+	+	+
10										o	+	+
11											o	o
12												o

a. Explique lo que se pretendía examinar con este experimento.

b. Utilice la misma lógica para asignar genotipos a cada uno de los 12 mutantes.

c. Explique por qué los híbridos F_1 entre los mutantes 1 y 2 presentan un fenotipo distinto al que presentan los híbridos F_1 obtenidos del cruzamiento entre los mutantes 1 y 5.

55. En el maíz, dos genes que actúan consecutivamente sobre precursores incoloros (blancos) controlan la síntesis de un pigmento púrpura:

$$\text{blanco 1} \xrightarrow{\text{gen } A} \text{blanco 2} \xrightarrow{\text{gen } B} \text{púrpura}$$

Las mutaciones sin sentido de carácter recesivo en ambos genes, a^s y b^s respectivamente, producen un fenotipo de color blanco. A su vez, la mutación T^M (alelo silvestre T^+), supresora de mutaciones sin sentido, suprime el efecto de las anteriores.

a. ¿Esperaría que el alelo T^M fuera dominante sobre T^+? Explíquelo.

b. Se autofecunda el trihíbrido A/a^s ; B/b^s ; T^M/T^+. Si los tres genes son independientes, ¿qué proporciones fenotípicas se observarían en la descendencia? Explíquelo, preferiblemente con un esquema.

56. Una planta, de la que se piensa que es heterocigótica para el par de alelos B/b (donde B determina color amarillo y b especifica color bronce), se autofecundó y produjo una descendencia compuesta de 280 individuos de color amarillo y 120 de color bronce. ¿Apoyan estos resultados la hipótesis de que dicha planta es de genotipo B/b?

57. Se cree que determinada planta es heterocigótica para dos genes independientes (P/p ; Q/q). Cuando se autofecundó generó la descendencia que se muestra:

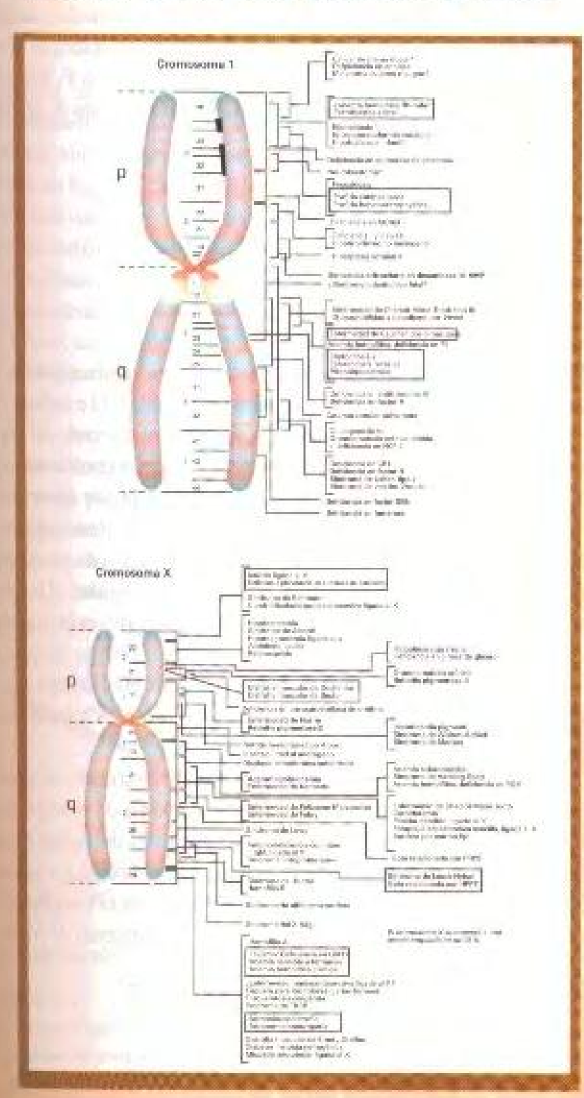
88 $P/-$; $Q/-$
32 $P/-$; q/q
25 p/p ; $Q/-$
14 p/p ; q/q

¿Apoyan estos resultados la hipótesis de que la planta original es de genotipo P/p ; Q/q?

58. Una planta de un determinado fenotipo «1» se autofecundó, generando 100 individuos del mismo fenotipo y 60 de otro fenotipo alternativo 2. ¿Son compatibles estos valores con las proporciones 9:7, 13:3 y 3:1? Formule una hipótesis genética basada en sus propios cálculos.

5

PRINCIPIOS DE CARTOGRAFÍA CROMOSÓMICA EN LOS EUCARIOTAS



Ideas fundamentales

Dos genes situados cerca uno del otro en el mismo par de cromosomas homólogos no muestran segregación independiente durante la meiosis.

La recombinación da lugar a genotipos con nuevas combinaciones de los alelos parentales.

Los cromosomas homólogos pueden intercambiar parte de su material en un proceso denominado entrecruzamiento.

La recombinación se produce por segregación independiente o por entrecruzamiento.

Los loci (lugares) que ocupan los genes en un cromosoma se pueden cartografiar midiendo las frecuencias de los recombinantes producidos por entrecruzamiento.

Las distancias entre loci obtenidas de los valores de las frecuencias de recombinación son aproximadamente aditivas.

Un hecho de entrecruzamiento puede afectar a que tenga lugar un segundo entrecruzamiento en una región adyacente.

Mapas del cromosoma 1 y del cromosoma X humanos. Las posiciones de los genes se han averiguado mediante varias técnicas, algunas de las cuales se describen en este capítulo y el siguiente. (Tomado del *Journal of NIH Research*, 1992.)

Hemos establecido ya los fundamentos básicos de la segregación y la distribución de los alelos, y la relación entre estos procesos y el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis. Así, en un cruzamiento *A/a* ; *B/b* × *A/a* ; *B/b*, esperamos una proporción de fenotipos 9:3:3:1. Como aprendimos de los estudios de Bridges sobre la no disyunción (pág. 76), las excepciones a las predicciones mendelianas pueden dirigir la atención del experimentador hacia nuevos descubrimientos. Fue precisamente una de estas excepciones, observada en la progenie de un cruzamiento dihíbrido, la que suministró la clave de los importantes conceptos que estudiaremos en este capítulo.

COROLARIO

En el análisis genético, las excepciones a los comportamientos previstos suelen ser el origen de nuevas e importantes ideas.

El descubrimiento del ligamiento

A inicios de la primera década del siglo XX, William Bateson y R. C. Punnett estaban analizando la herencia en una variedad de guisante. Estudiaban dos genes: uno que afectaba al color de la flor (*P*, púrpura, y *p*, rojo) y otro que afectaba a la forma de los granos de polen (*L*, alargado, y *l*, redondo). Cruzaron líneas puras *P/P* · *L/L* (púrpura, alargado) × *p/p* · *l/l* (rojo, redondo), y autofecundaron la F_1 heterocigótica para obtener la F_2. El Cuadro 5-1 muestra las proporciones de cada fenotipo en las plantas F_2.

Los fenotipos de la F_2 se desviaron llamativamente de la proporción 9:3:3:1 esperada. ¿Qué estaba ocurriendo? Esto no parecía que pudiera explicarse como una modificación de las proporciones mendelianas. Observe que dos de las clases fenotípicas son más abundantes de lo esperado: los fenotipos «púrpura, alargado» y «rojo, redondo». Como posible explicación, Bateson y Punnett propusieron que la F_1 producía más gametos *P* · *L* y *p* · *l* de los esperados de la segregación independiente mendeliana. Puesto que estos genotipos eran los mismos de los gametos de las líneas puras originales, los investigadores pensaron que alguna forma de **acoplamiento** físico entre los alelos dominantes *P* y *L*, y entre los alelos recesivos *p* y *l*, les impedía segregar de manera independiente en la F_1. No sabían, sin embargo, cuál podía ser la naturaleza de este acoplamiento.

CUADRO 5-1. Fenotipos de guisantes en la F_2 estudiada por Bateson y Punnett

Fenotipo (y genotipo)	NÚMERO DE DESCENDIENTES: Observados	Esperados de la proporción 9:3:3:1
púrpura, alargado (*P/–* · *L/–*)	4831	3911
púrpura, redondo (*P/–* · *l/l*)	390	1303
rojo, alargado (*p/p* · *L/–*)	393	1303
rojo, redondo (*p/p* · *l/l*)	1338	435
	6952	6952

La confirmación de la hipótesis de Bateson y Punnett tuvo que esperar al establecimiento de *Drosophila* como herramienta genética. Después de que se propusiera por primera vez la idea de acoplamiento, Thomas Hunt Morgan encontró un caso similar de desviación de la segunda ley de Mendel cuando estudiaba dos genes autosómicos de *Drosophila*. Uno de estos genes afectaba al color de los ojos (*pr*, púrpura, y pr^+, rojo) y el otro a la longitud del ala (*vg*, vestigial, y vg^+, normal). En ambos genes, los alelos silvestres son los dominantes. Morgan cruzó moscas *pr/pr* · *vg/vg* con moscas $pr^+/pr^+ \cdot vg^+/vg^+$ y, posteriormente, realizó un cruzamiento de prueba con las hembras doble heterocigóticas: $pr^+/pr \cdot vg^+/vg$ ♀ × *pr/pr* · *vg/vg* ♂.

La utilización del cruzamiento de prueba es de gran importancia. Puesto que un parental (el de prueba) contribuye con gametos que contienen únicamente alelos recesivos, los fenotipos de la descendencia revelan la contribución de alelos en los gametos del otro parental doble heterocigótico. Es por ello que el investigador puede concentrarse en el análisis de la meiosis de tan sólo uno de los parentales y olvidarse de la del otro. Esto contrasta con el análisis de la progenie de la autopolinización de la F_1, donde hay que tener en cuenta dos tipos de meiosis: una del parental masculino y otra del femenino. Los resultados de Morgan, donde los alelos aportados por la hembra de la F_1 determinan los fenotipos de la descendencia del cruzamiento de prueba, fueron los siguientes:

$pr^+ \cdot vg^+$	1339
$pr \cdot vg$	1195
$pr^+ \cdot vg$	151
$pr \cdot vg^+$	154
	2839

Obviamente, estos números se desvían espectacularmente de la predicción mendeliana de una proporción 1:1:1:1, e indican un acoplamiento de genes. Las dos clases más numerosas, $pr^+ \cdot vg^+$ y $pr \cdot vg$, son las combinaciones introducidas originalmente por las moscas homocigóticas parentales. Como puede observarse, el cruzamiento de prueba clarifica la situación. Revela directamente las combinaciones alélicas de los gametos de uno de los sexos de la F_1, de forma que se muestra con claridad el acoplamiento que Bateson y Punnett pudieron tan sólo inferir tras la autopolinización de la F_1. Además, el cruzamiento de prueba revela algo nuevo: no sólo se observa una proporción aproximada 1:1 entre los dos tipos parentales, sino también entre los dos tipos no parentales.

Veamos ahora lo que se puede aprender repitiendo los cruzamientos, pero con el cambio de las combinaciones de alelos presentes en los gametos de los homocigotos parentales del primer cruzamiento. En esta situación, cada parental era homocigótico para un alelo dominante y otro recesivo. Al igual que en el caso anterior, las hembras de la F_1 se sometieron a un cruzamiento de prueba:

P $\quad pr^+/pr^+ \cdot vg/vg \times pr/pr \cdot vg^+/vg^+$

↓

$F_1 \quad pr^+/pr \cdot vg^+/vg$

$pr^+/pr \cdot vg^+/vg$ ♀ × $pr/pr \cdot vg/vg$ ♂

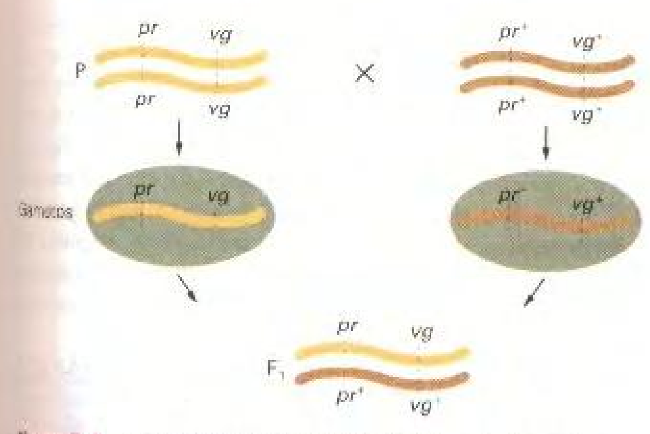


Figura 5-1. Herencia simple de dos parejas de alelos situadas en el mismo par cromosómico.

Se obtuvo la siguiente descendencia del cruzamiento de prueba:

$pr^+ \cdot vg^+$	157
$pr \cdot vg$	146
$pr^+ \cdot vg$	965
$pr \cdot vg^+$	1067
	2335

De nuevo, estos resultados no se acercan siquiera a una proporción mendeliana 1:1:1:1. Ahora, sin embargo, las clases más numerosas son las que reciben uno u otro alelo dominante de la madre, en lugar de dos alelos dominantes o dos recesivos, como en el caso anterior. No obstante, hay que destacar una vez más que las combinaciones de alelos que las hembras de la F_1 recibieron de sus parentales constituyen las clases más frecuentes de la descendencia del cruzamiento de prueba. En su trabajo pionero sobre el acoplamiento, Bateson y Punnett acuñaron el término **repulsión** para describir esta situación, ya que les pareció que, en este caso, los alelos dominantes de ambos genes se «repelían» entre sí —lo contrario a lo que ocurría en el acoplamiento, donde los alelos dominantes parecían estar «pegados»—. ¿Cuál es la explicación para los fenómenos de acoplamiento y repulsión?

Morgan sugirió que los genes implicados en ambos fenómenos estaban situados *sobre el mismo par de cromosomas homólogos*. De esta manera, cuando *pr* y *vg* se transfieren desde un parental, se encuentran físicamente localizados en el mismo cromosoma, mientras que pr^+ y vg^+ se transmiten en el cromosoma homólogo procedente del otro parental (Fig. 5-1). Esta hipótesis explica también la repulsión. En este caso, un cromosoma parental lleva *pr* y vg^+ y el otro pr^+ y *vg*. Por lo tanto, la repulsión no es más que otro caso de acoplamiento: en esta situación, el alelo dominante de un gen está acoplado al alelo recesivo del otro gen. La hipótesis explica por qué las combinaciones de alelos de los parentales permanecen juntas. No obstante, ¿cómo explicar la aparición de las combinaciones no parentales?

Morgan propuso que, cuando los cromosomas homólogos aparean durante la meiosis, se produce ocasionalmente un intercambio de partes de esos cromosomas en un proceso denominado **entrecruzamiento**. La Figura 5-2 ilustra este intercambio físico de segmentos cromosómicos. Las dos combinaciones nuevas reciben la denominación de **productos del entrecruzamiento**.

Esta hipótesis puede parecer un poco rebuscada. ¿Existe algún proceso observable citológicamente que permita explicar la existencia del entrecruzamiento? Vimos en el Capítulo 3 que durante la meiosis, cuando los cromosomas homólogos duplicados aparean entre sí, a menudo dos cromátidas no hermanas aparecen entrecruzadas, tal y como se representa en la Figura 5-3. Recuerde que la estructura cruciforme resultante recibe el nombre de *quiasma*. Para Morgan, la existencia de los quiasmas era la corroboración visual del concepto de entrecruzamiento. (Téngase en cuenta que los quiasmas parecen indicar que el entrecruzamiento tiene lugar entre cromátidas y no entre cromosomas no duplicados. Volveremos a tomar este punto más tarde). Observe que Morgan no llegó a esta interpretación partiendo de la nada, sino que buscaba una explicación *física* para sus resultados *genéticos*. Su éxito en relacionar los resultados de los cruzamientos genéticos con los fenómenos citológicos le da aún más énfasis a la importancia de la teoría cromosómica de la herencia como una herramienta poderosa de investigación.

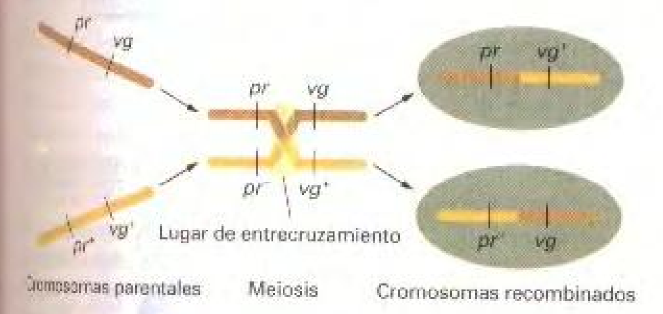


Figura 5-2. Entrecruzamiento durante la meiosis. Un individuo recibe un cromosoma homólogo de cada progenitor. El intercambio de partes de los cromosomas por entrecruzamiento puede generar cromosomas gaméticos cuyas combinaciones de alelos difieren de las combinaciones parentales.

COROLARIO

Los quiasmas son las manifestaciones visibles de los entrecruzamientos.

Datos como los presentados, en los que se muestra el acoplamiento y la repulsión en los cruzamientos de prueba y en las autopolinizaciones de la F_1, se observan con frecuencia en los estudios genéticos. Resultados de este tipo representan una obvia desviación de la segregación independiente. De hecho, tales excepciones constituyen un añadido importante a la visión de Mendel del mundo de la Genética.

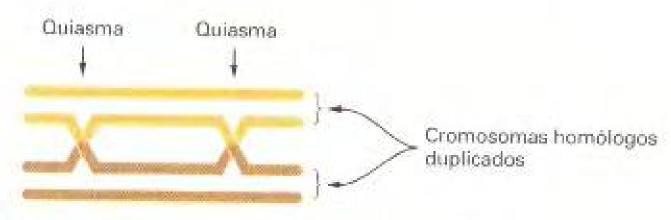


Figura 5-3. Representación simplificada de los quiasmas durante la meiosis. Cada línea representa una cromátida de una pareja cromosómica en sinapsis.

COROLARIO

Dos genes situados cerca uno del otro en el mismo par de cromosomas homólogos no segregan independientemente.

La situación en la que dos genes residen en el mismo par de cromosomas homólogos recibe la denominación de **ligamiento**. Dos genes localizados en el mismo par de cromosomas homólogos decimos que están *ligados*. Es propio también referirse al ligamiento de alelos específicos: por ejemplo, en un individuo $A/a \cdot B/b$, A podría estar ligado a b, de forma que a estaría necesariamente ligado a B. Estos términos aluden gráficamente a la existencia de una entidad física que liga los genes, esto es, el propio cromosoma. Cualquiera podría preguntarse por qué nos referimos a los genes como «ligados» en lugar de «acoplados»; la respuesta es que los términos acoplamiento y repulsión se emplean en la actualidad para indicar dos tipos diferentes de situaciones de ligamiento en un doble heterocigoto, a saber:

Fase de acoplamiento $\dfrac{pr \quad vg}{pr^+ \quad vg^+}$

Fase de repulsión $\dfrac{pr \quad vg^+}{pr^+ \quad vg}$

En otras palabras, el acoplamiento hace mención al ligamiento entre dos alelos dominantes o dos recesivos, mientras que la repulsión indica que los alelos dominantes están ligados a los alelos recesivos. Para averiguar si un doble heterocigoto está en fase de acoplamiento o en la de repulsión, hay que tener en cuenta los genotipos de sus parentales o realizar con él un cruzamiento de prueba.

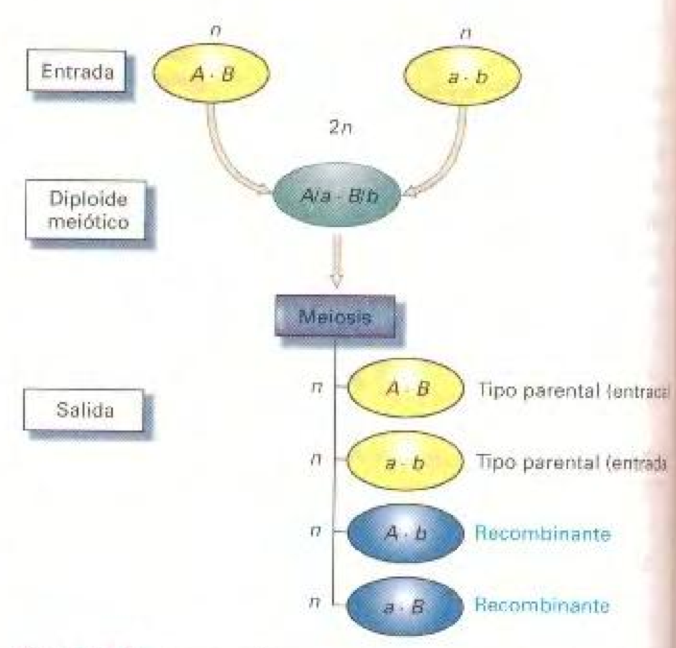


Figura 5-4. Los recombinantes son aquellos productos de la meiosis con combinaciones de alelos distintas de las presentes en las células haploides que dieron lugar al diploide meiótico.

Recombinación

En el análisis genético moderno, la prueba principal para determinar si dos genes están ligados se basa en el concepto de la recombinación. La recombinación se puede observar en una amplia variedad de situaciones, si bien vamos a definirla de momento en relación a la meiosis. La **recombinación meiótica** es

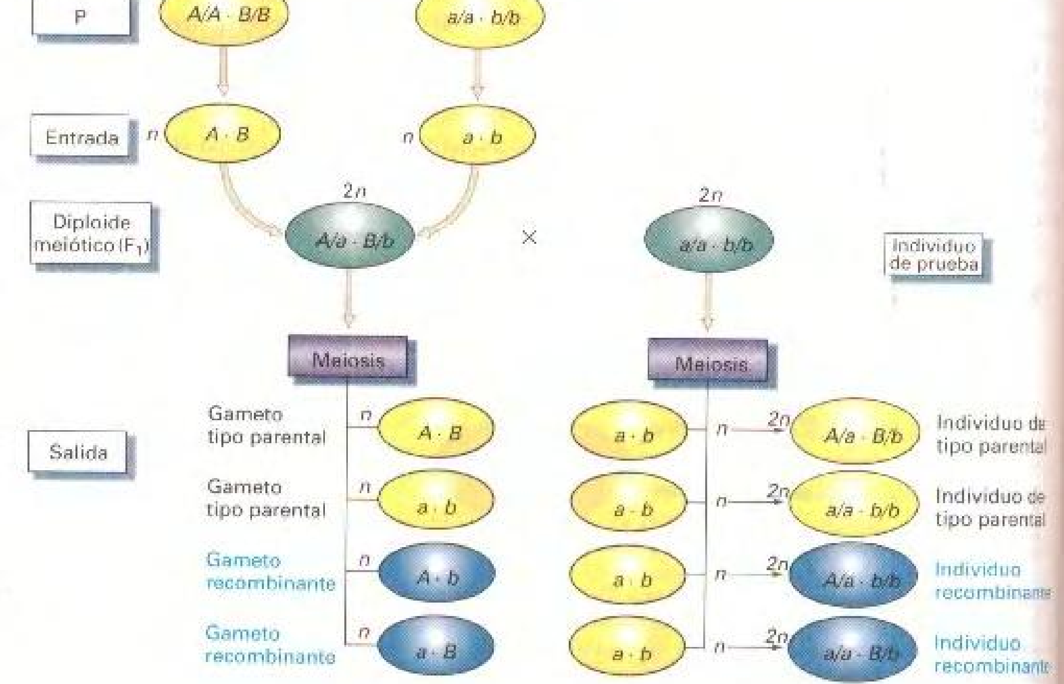


Figura 5-5. Detección de la recombinación en los organismos diploides. Observe que la Figura 5-4 es una parte de este diagrama. La mejor manera de detectar los productos meióticos recombinantes en los organismos haploides es realizar un cruzamiento entre un individuo heterocigoto y otro homocigoto recesivo (cruzamiento de prueba).

cualquier proceso meiótico que da lugar a un producto haploide cuyo genotipo difiere de los dos genotipos haploides que formaron la célula meiótica diploide. El producto así generado se denomina **recombinante**. El punto importante de esta definición se establece en la detección de la recombinación mediante la comparación de los genotipos de *salida* de la meiosis con los de *entrada* parentales (Fig. 5-4). Los genotipos de entrada son los dos genotipos haploides que se combinaron para dar lugar a la constitución genética del meiocito, la célula diploide que sufre la meiosis.

COROLARIO

Durante la meiosis, la recombinación genera genotipos haploides diferentes de los genotipos parentales haploides.

La recombinación meiótica forma parte tanto de los ciclos de vida haploides como de los diploides; sin embargo, la detección de los recombinantes en los ciclos haploides es más directa, mientras que en los ciclos diploides requiere más trabajo. En los ciclos haploides, los genotipos de entrada y de salida son los mismos que los de los individuos, de manera que pueden inferirse directamente de los fenotipos. La Figura 5-4 resume la simplicidad de la detección de los recombinantes en los ciclos de vida haploides. Los tipos de entrada y de salida son los gametos. Puesto que para detectar los recombinantes en un ciclo diploide debemos conocer los gametos de entrada, es preferible que los progenitores sean líneas puras. Además, no podemos reconocer de manera directa los gametos recombinantes que salen: tenemos que someter al individuo diploide a un cruzamiento de prueba y analizar su progenie (Fig. 5-5). Si un descendiente de un cruzamiento de prueba se ha formado a partir de un producto recombinante de la meiosis, también recibe la denominación de *recombinante*. Observe de nuevo que el cruzamiento de prueba permite que nos concentremos en *una sola* meiosis, evitando así ambigüedades. En la Figura 5-5, por ejemplo, si fuera factible autopolinizar la F_1, no podríamos distinguir a un descendiente recombinante *A/A · B/b* de uno *A/A · B/B* sin realizar cruzamientos adicionales. Los recombinantes se producen mediante dos procesos celulares distintos: segregación independiente y entrecruzamiento.

Recombinación mediante segregación independiente

La Figura 5-6 muestra el concepto de *recombinación* mediante segregación independiente. En un cruzamiento de prueba, las dos clases recombinantes representan siempre el 50 % de la descendencia; esto es, hay un 25 % de cada tipo recombinante entre la descendencia.

Si en un cruzamiento de prueba observamos una frecuencia de recombinantes del 50 %, podemos inferir que los dos genes implicados segregan independientemente. La interpretación más simple de este resultado es que los dos genes se encuentran en pares de cromosomas homólogos distintos. Sin embargo, genes situados en posiciones lejanas en el *mismo* par de cromosomas pueden comportarse como si no estuvieran ligados y dar el mismo resultado de la segregación independiente.

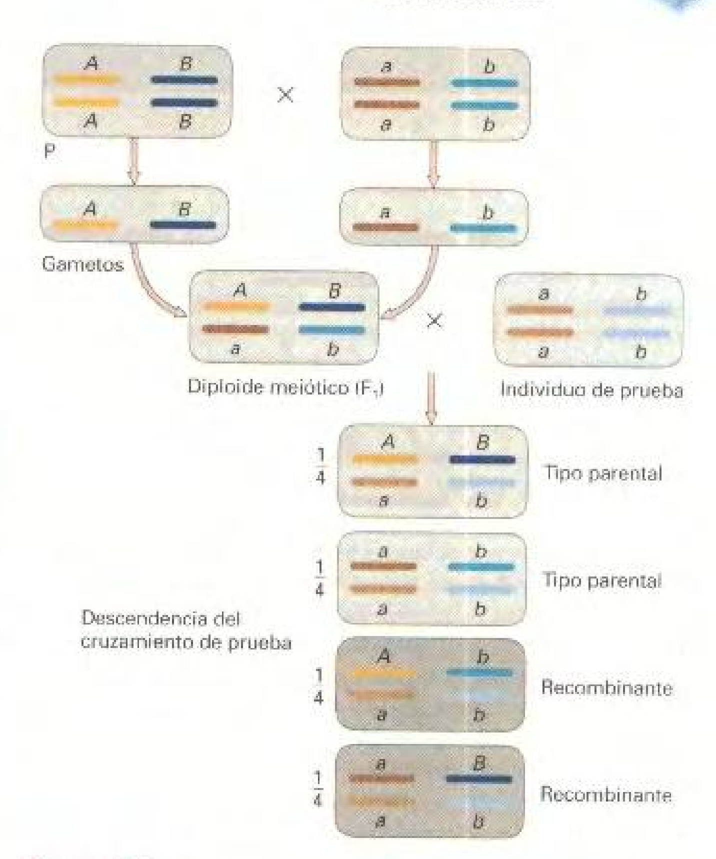


Figura 5-6. La segregación independiente produce siempre una frecuencia de recombinación del 50 %. Este diagrama muestra dos pares de cromosomas homólogos de un organismo diploide, con los alelos *A* y *a* en uno de los pares cromosómicos y los alelos *B* y *b* en el otro. Observe que podríamos haber representado la situación en un organismo haploide eliminando el cruzamiento parental (P) y el de prueba.

Recombinación mediante entrecruzamiento

Los recombinantes también pueden aparecer a través del entrecruzamiento. Esto ocurre entre cualquiera de dos cromátidas no hermanas (se presentarán pruebas de ello en el Cap. 6). No se trata de que haya un entrecruzamiento entre dos genes específicos en todas las meiosis; pero cuando lo hay, como se muestra en la Figura 5-7, la mitad de los productos de *esa* meiosis son recombinantes. Las meiosis sin entrecruzamiento entre dos loci génicos producen únicamente genotipos parentales para los genes estudiados.

Para los genes situados muy cerca en el mismo par cromosómico, el ligamiento físico de las combinaciones de los alelos parentales hace imposible la segregación independiente, dando lugar, por tanto, a fecuencias de recombinantes significativamente menores del 50 % (Fig. 5-8). Observamos un ejemplo de esta situación en los datos de Morgan (página 142), donde la frecuencia de los recombinantes era (151 + 154) : 2839 = 10.7 %. Obviamente, el resultado es mucho menor del 50 % que esperaríamos de la segregación independiente. La frecuencia de los recombinantes que aparecen por entrecruzamiento entre genes ligados oscila desde 0 a 50 %, dependiendo de la distancia entre los genes. ¿Qué ocurre con las frecuencias de recombinantes

	Cromosomas meióticos	Productos meióticos	
Meiosis sin entrecruzamiento entre los genes	*A* *B*	*A* *B*	Parental
	A *B*	*A* *B*	Parental
	a *b*	*a* *b*	Parental
	a *b*	*a* *b*	Parental
Meiosis con un entrecruzamiento entre los genes	*A* *B*	*A* *B*	Parental
	A *B*	*A* *b*	Recombinante
	a *b*	*a* *B*	Recombinante
	a *b*	*a* *b*	Parental

Figura 5-7. La recombinación se produce en aquellas meiosis en las que ha[y] entrecruzamiento de cromátidas no hermanas entre los genes en estudio.

mayores del 50 %? La respuesta es que tales frecuencias, como veremos en el Capítulo 6, *nunca* se observan.

Observe en la Figura 5-7 que cada entrecruzamiento genera dos productos recíprocos, lo que explica que las frecuencias de las clases de recombinantes sean aproximadamente iguales.

COROLARIO

Una frecuencia de recombinantes significativamente menor del 50 % indica que los genes están ligados. Una frecuencia de recombinantes del 50 % significa generalmente que los genes no están ligados y se hallan en cromosomas distintos.

El resto del capítulo trata fundamentalmente de genes ligados y de los recombinantes que aparecen por entrecruzamiento.

Simbolismo del ligamiento

Con la introducción del ligamiento, nuestros símbolos para la descripción de los cruzamientos se hacen un tanto incómodos. En el cruzamiento de *Drosophila*, podemos representar la constitución genética de cada cromosoma como en el ejemplo siguiente:

$$\frac{pr \quad vg}{pr^{+} \quad vg^{+}}$$

donde cada línea representa un cromosoma; los alelos de arriba están en un cromosoma y los de abajo en el otro cromosoma homólogo. Un entrecruzamiento se representa colocando una × entre los dos cromosomas, de manera que

$$\frac{pr \qquad vg}{\times}\over{pr^{+} \qquad vg^{+}}$$

es lo mismo que

$$pr \quad \times \quad vg$$
$$pr^{+} \qquad vg^{+}$$

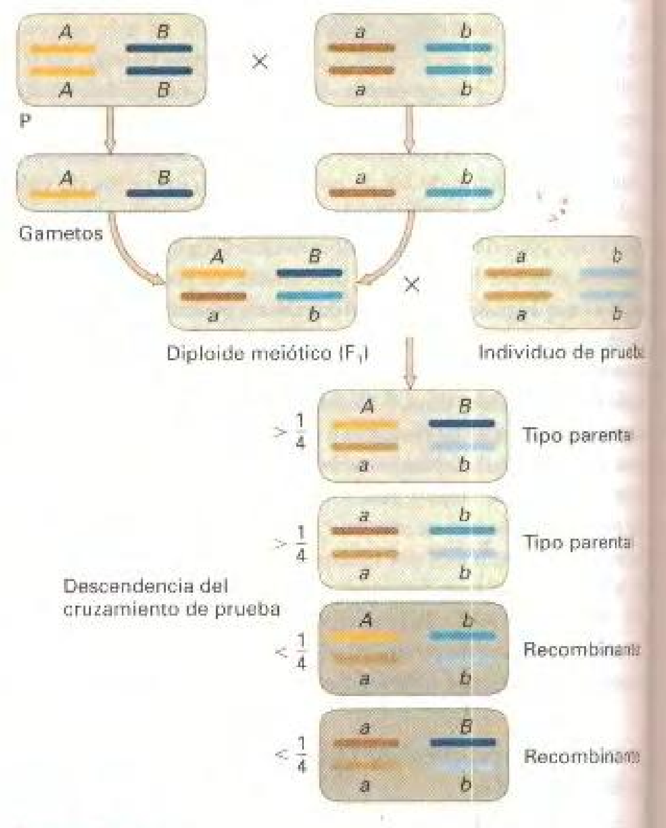


Figura 5-8. Recombinación por entrecruzamiento. Observe que la suma de las frecuencias de los recombinantes da un valor inferior al 50 %.

Podemos simplificar la designación genotípica de los genes lig[a]dos dibujando una única línea, siendo los genes que están a ca[da] lado los que se encuentran en el mismo cromosoma; ahora nue[s]tro símbolo es

$$\frac{pr \quad vg}{pr^{+} \quad vg^{+}}$$

No obstante, todavía resulta incómodo escribir esto a mano o [a] máquina, de manera que podemos inclinar la línea para obten[er] *pr vg*/*pr*$^{+}$ *vg*$^{+}$, manteniendo aún los alelos de un cromosoma a [...]

lado de la línea y los del homólogo al otro lado. Siempre anotamos los genes en el mismo orden a cada uno de los lados: hablamos siempre de *a b/a b*, nunca *a b/b a*. La norma de que los genes se escriban siempre en el mismo orden permite a los genetistas emplear una notación abreviada, en la que se representa el alelo silvestre sólo con un signo más. En esta anotación, el genotipo $pr\ vg/pr^+\ vg^+$ lo escribimos $pr\ vg/+\ +$. Esta anotación puede verse en otros libros y en artículos de investigación.

Como se ha visto en los capítulos anteriores, los genes situados en parejas cromosómicas distintas se separan con un punto y coma, *A/a* ; *B/b*, por ejemplo. En este libro, los genes que no sabemos si están o no ligados se separan por un punto *A/a* · *B/b*.

Si consideramos de nuevo los resultados obtenidos por Bateson y Punnett, podemos explicar fácilmente el fenómeno de acoplamiento utilizando el concepto de ligamiento. Sus resultados son complejos, debido a que no hicieron el cruzamiento de prueba. Sin embargo, más tarde veremos que también se pueden calcular los números de los tipos recombinantes y parentales en un cruzamiento dihíbrido.

Ligamiento de genes en el cromosoma X

Hasta ahora, hemos tenido en cuenta la recombinación entre genes autosómicos. ¿Cuáles son las consecuencias de un entrecruzamiento de cromátidas no hermanas entre dos genes de interés del cromosoma X? Recuerde que en la especie humana o en *Drosophila*, las hembras tienen descendencia masculina hemicigótica para los genes del cromosoma X, de forma que los fenotipos de los hijos dependen tan sólo de los genotipos de los gametos aportados por la madre. Consideremos un ejemplo en el que primero se observa la descendencia F_1 de un cruzamiento entre dos moscas *Drosophila* y, con posterioridad, analizamos la descendencia F_2 producida al cruzar entre sí los individuos de la F_1. En este ejemplo, utilizaremos los siguientes símbolos: y e y^+ para los alelos que determinan cuerpo amarillo y cuerpo marrón, respectivamente; w y w^+ para los alelos que determinan ojo blanco y ojo rojo; e Y para el cromosoma Y.

P $\quad y\ w^+/y\ w^+$ ♀ × $y^+\ w/$Y ♂

↓

F_1 $\quad y\ w^+/y^+\ w$ ♀ × $y\ w^+/$Y ♂

El número de machos para cada clase fenotípica de la F_2 es:

$y\ w$	43	recombinantes
$y^+\ w$	2146	parentales
$y\ w^+$	2302	parentales
$y^+\ w^+$	22	recombinantes
	4513	

Dado que los machos de la F_2 obtienen de los machos de la F_1 solamente el cromosoma Y, estas clases reflejan a la perfección los productos de las meiosis de las hembras F_1. Observe que esto elimina la necesidad de realizar un cruzamiento de prueba; podemos seguir la meiosis de un solo progenitor, de la misma forma que lo haríamos en un cruzamiento de prueba. La frecuencia total de los recombinantes en este ejemplo es (43 + 22) : 4513 = = 1,4 %.

Mapas de ligamiento

La frecuencia de recombinantes para los genes autosómicos de *Drosophila* que hemos estudiado (*pr* y *vg*) correspondía al 10,7 % de la descendencia —una frecuencia mucho menor que la de los genes ligados del cromosoma X analizados en el apartado anterior—. Aparentemente, hay diferencias en el número de entrecruzamientos que se dan entre distintos genes ligados. Ciertamente, no hay razón para esperar que las cromátidas se entrecrucen con la misma frecuencia entre diferentes genes ligados. Conforme Morgan estudió más genes, observó que la proporción de la descendencia recombinante variaba considerablemente, dependiendo de qué genes ligados estuviera analizando, y pensó que estas variaciones en la frecuencia de entrecruzamientos podían indicar de alguna manera las distancias reales que separaban unos genes de otros en los cromosomas. Morgan asignó el estudio de este problema a uno de sus estudiantes, Alfred Sturtevant, que (al igual que Bridges) se convertiría en un gran genetista. Morgan pidió a Sturtevant, un estudiante de licenciatura por entonces, que diera algún sentido a los datos de entrecruzamiento entre diferentes genes ligados. En una noche, Sturtevant desarrolló un método que todavía se utiliza hoy para describir las relaciones de ligamiento entre genes. Con las propias palabras de Sturtevant, «a finales de 1911, en una conversación con Morgan, me di cuenta de repente que las variaciones en la magnitud del ligamiento, ya atribuidas por Morgan a diferencias en la separación espacial de los genes, ofrecían la posibilidad de determinar el orden de los genes en la dimensión lineal de un cromosoma. Me fui a casa y pasé toda la noche (en perjuicio de mis labores de estudiante) elaborando el primer mapa cromosómico».

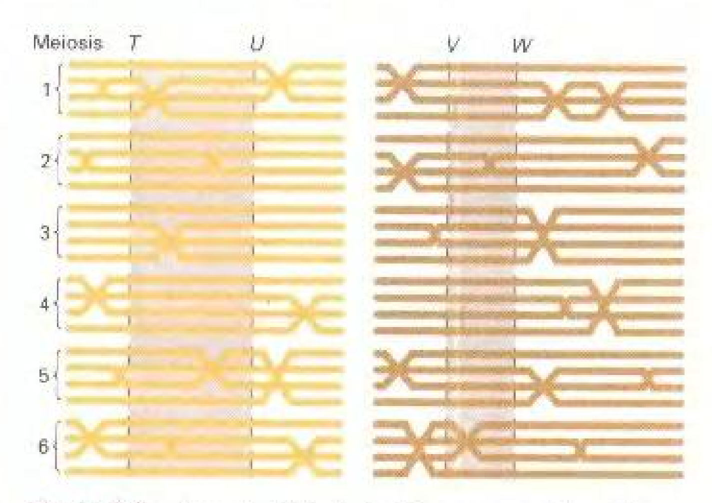


Figura 5-9. Proporcionalidad entre las distancias cromosómicas y las frecuencias de recombinación. Las cromátidas se entrecruzan de manera aleatoria a lo largo del cromosoma durante las meiosis. La distancia que separa los genes *T* y *U* en un cromosoma es mayor que la que hay en otro cromosoma entre los genes *V* y *W*. Las cromátidas se entrecruzan entre *T* y *U* en una proporción de las meiosis mayor que la que se da entre *V* y *W*. Como veremos más adelante en este capítulo, un entrecruzamiento puede ocurrir entre dos cromátidas no hermanas cualesquiera.

Como ejemplo de la lógica que siguió Sturtevant, consideremos un cruzamiento de prueba para el que se obtienen los resultados siguientes:

$pr\ vg/pr\ vg$	165	parentales
$pr^{+}\ vg^{+}/pr\ vg$	191	
$pr\ vg^{+}/pr\ vg$	23	recombinantes
$pr^{+}\ vg/pr\ vg$	21	
	400	

En este ejemplo, la descendencia representa 400 gametos femeninos, 44 de los cuales (11 %) son recombinantes. Sturtevant sugirió que el porcentaje de recombinantes se podía utilizar como indicativo cuantitativo de la distancia entre dos genes en un **mapa genético**, o **mapa de ligamiento**, como se le denomina a veces.

Aquí, la idea básica es bastante sencilla. Imagine dos genes concretos situados a una cierta distancia uno del otro. Ahora, imagine que los entrecruzamientos suceden al azar a lo largo de los cromosomas homólogos apareados. En algunas de las divisiones meióticas, se produce, de forma aleatoria, un entrecruzamiento entre las cromátidas no hermanas en la región cromosómica que separa los dos genes; en estas meiosis se forman los recombinantes. En otras meiosis, no se producen entrecruzamientos entre estos genes; en estas meiosis no se obtienen recombinantes. Sturtevant propuso que, con una cierta aproximación, se cumplía la siguiente relación: cuanto mayor es la distancia entre genes ligados, mayor es la probabilidad de que tenga lugar un entrecruzamiento entre cromátidas no hermanas dentro de la región comprendida entre los genes y, por tanto, mayor la proporción de recombinantes que se obtienen. Así, se puede obtener una medida de la distancia entre los genes, mediante la determinación de la frecuencia de recombinantes (Fig. 5-9). De hecho, podemos definir una **unidad de mapa genético (m.u.)** como la distancia entre los genes para la que uno de cada 100 productos de la meiosis es recombinante. Dicho de otra manera, una **frecuencia de recombinación (RF)** de 0.01 (1 %) se defin como 1 m.u. (la unidad de mapa recibe también la denominació de centimorgan [cM], en honor de Thomas Hunt Morgan).

Una consecuencia directa de la forma en la que se mide la dis tancia de mapa es que si los genes *A* y *B* están separados por 5 unidades de mapa (5 m.u.) y los genes *A* y *C* están separados por 3 m.u., los genes *B* y *C* deberían estar a una distancia de 8 ó 2 m.u. (Fig. 5-10). Sturtevant comprobó que esto era lo que sucedía. En otras palabras, su análisis apoyaba contundentemente la idea de que los genes se organizan según algún tipo de ordenamiento lineal.

El lugar que ocupa un gen en el mapa, y en el cromosoma recibe el nombre de **locus génico** (en plural, **loci**). Por ejemplo el locus del gen para el color de los ojos y el del gen para la longitud de las alas están a una distancia de 11 m.u. La relación suele representarse de la siguiente manera:

pr ——— 11.0 ——— *vg*

aunque igualmente podría representarse así:

pr^{-} ——— 11.0 ——— vg^{+}

o así:

← 11.0 →

Locus del gen para el color de los ojos — Locus del gen para la forma de las alas

Normalmente, nos referimos al locus de este gen para el color de los ojos, de forma abreviada, como el «locus *pr*», que no es si mencionar el nombre del primer alelo no silvestre aislado, y no obstante, con ello nos estamos refiriendo al lugar en el cromosoma donde podremos encontrar cualquier alelo de este gen.

Dada una distancia genética en unidades de mapa, podemos predecir la frecuencia de las diferentes clases de la descendencia. Por ejemplo, entre la descendencia de un cruzamiento de prueba de u

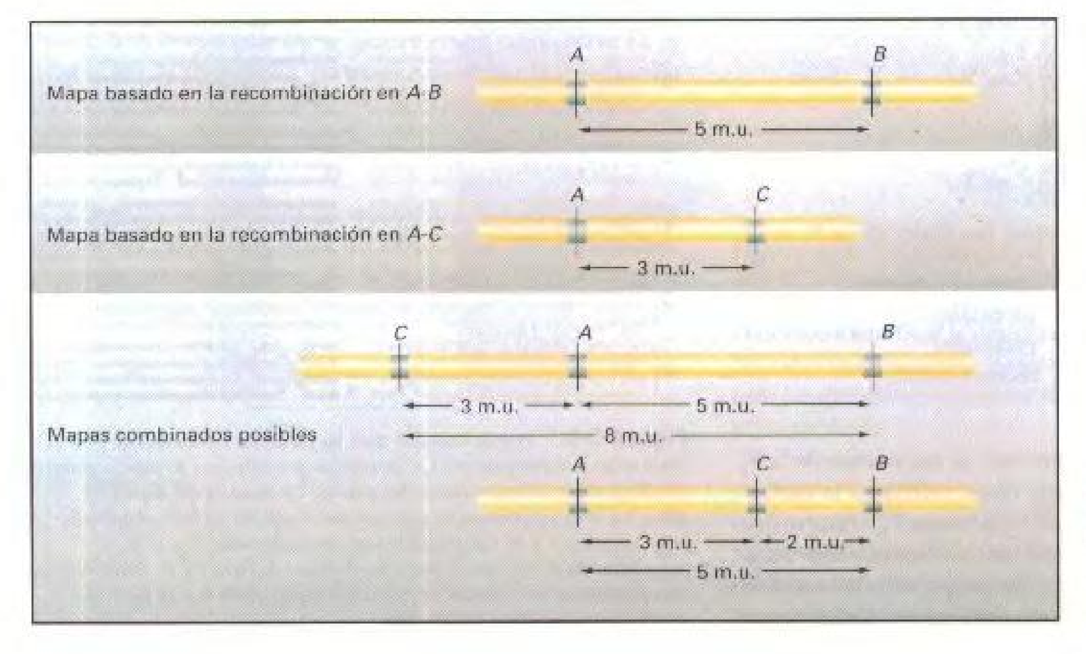


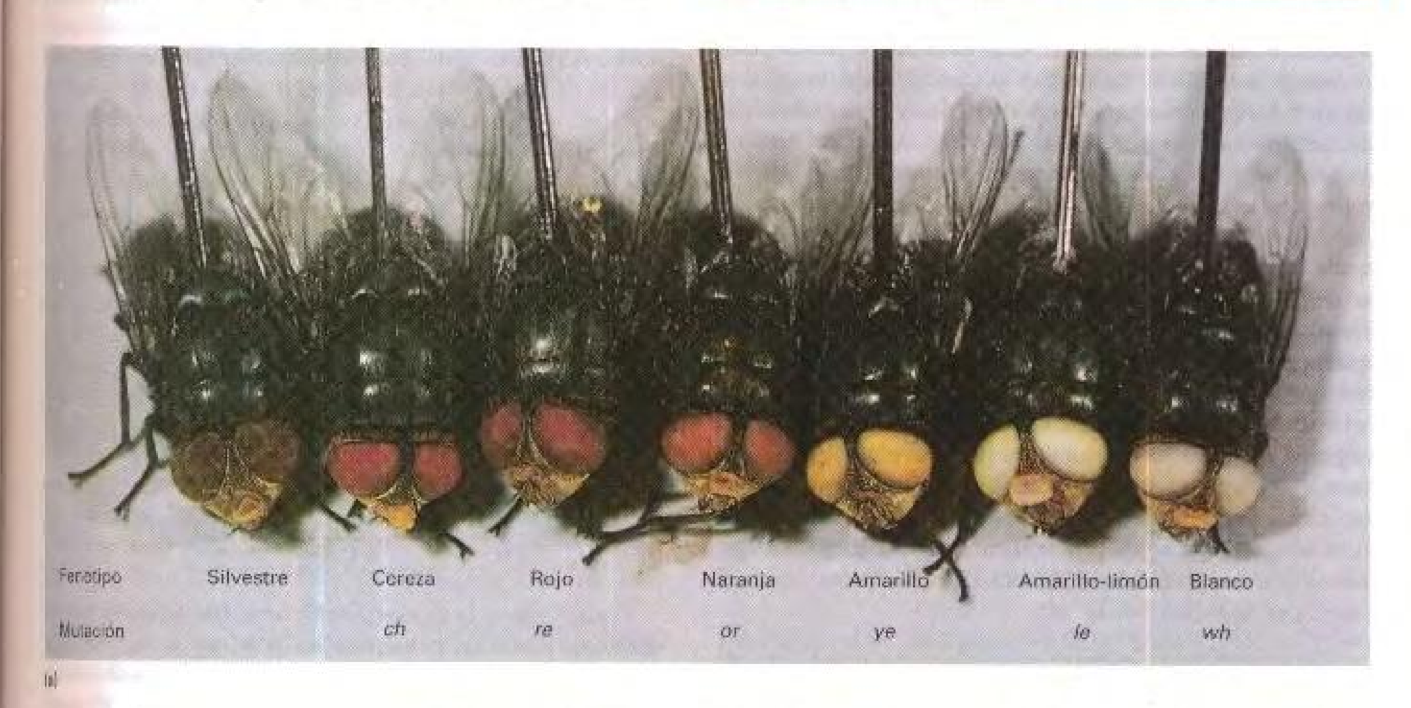
Figura 5-10. Dado que las distancias de mapa son aditiva cálculo de las distancias *A-B* y *A-C* nos deja con las dos alternativas para la distancia *B-C* que aparecen en la figura.

hembra heterocigótica *pr vg/pr⁻ vg⁺*, sabemos que habrá un 11 % de recombinantes, de los que un 5.5 % serán de la clase $pr\ vg^+/pr\ vg$ y otro 5.5 % de la $pr^+\ vg/pr\ vg$; y entre la descendencia de un cruzamiento de prueba de una hembra heterocigótica $pr\ vg^-/pr^+\ vg$, un 5.5 % será *pr vg/pr vg* y otro 5.5 % $pr^+\ vg^+/pr\ vg$.

La conclusión directa de todo esto es que la «distancia» en el mapa de ligamiento se corresponde con la distancia física a lo largo del cromosoma y, en realidad, ésta fue la idea a la que llegaron Morgan y Sturtevant. En todo caso, hay que destacar el hecho de que el mapa genético constituye un ejemplo más de entidad abstracta construida exclusivamente a partir del análisis genético. El mapa de ligamiento se podría haber obtenido incluso sin el conocimiento previo de la existencia de los cromosomas. Además, llegados a este punto de nuestra presentación, no podemos decir si las «distancias genéticas» calculadas por medio de las frecuencias de recombinación representan de alguna manera las distancias físicas reales en los cromosomas, aunque los análisis citogenéticos y moleculares han demostrado que las distancias genéticas son, de hecho, aproximadamente proporcionales a las distancias cromosómicas. No obstante, conviene recalcar que la estructura hipotética (el mapa de ligamiento) se elaboró teniendo presente una estructura muy real (el cromosoma). En otras palabras, la teoría cromosómica proporcionó la base para el desarrollo de la cartografía por ligamiento.

COROLARIO

La recombinación entre genes ligados sirve para cartografiar la distancia que los separa en el cromosoma. La unidad de mapa (1 m.u.) se define como una frecuencia de recombinación igual al 1 %.



(a)

X Y 2 3 4 5 6

2: Gpd — 43 — re — 39 — ch, Odh
3: wh — 5.7 — le — 2.9 — Pgm
4: or — 42 — Amyt
6: ye — 48 — cw

(b)

Figura 5-11. *(a)* Adulto silvestre de la mosca *Cochliomyia hominivorax* y seis mutantes cuyos colores de ojos están determinados por alelos de seis loci autosómicos distintos. *(b)* Mapa de ligamiento de los seis loci para el color de los ojos (destacados en color) y de otros cinco loci de la mosca. Los números entre los loci indican las frecuencias de recombinación. (D. B. Taylor, USDA.)

El análisis que hemos realizado en la presentación queda perfectamente ilustrado con los mapas de ligamiento en la mosca *Cochliomyia hominivorax*. El estadio larvario de este insecto —el gusano— parasita las heridas de los mamíferos y causa graves daños al ganado en algunas partes del mundo. Con la intención de controlar las poblaciones de este parásito, se ha propuesto un sistema genético que ha demostrado su éxito con otros insectos. Para alcanzar este objetivo, se necesita conocer la genética básica del insecto, uno de cuyos puntos fundamentales es la elaboración de un mapa de sus cromosomas. Este animal tiene seis parejas de cromosomas, cuya cartografía genética ya se ha iniciado.

La elaboración de un mapa genético amplio comienza por el aislamiento y análisis del mayor número posible de variantes fenotípicas. Los genetistas han encontrado diversas variantes del estadio adulto de este insecto, la mosca. Encontraron individuos de seis colores distintos de ojos, todos ellos diferentes del color marrón de los ojos de las moscas silvestres, como muestra la Figura 5-11*a*. Asimismo, encontraron cinco variantes fenotípicas de otros caracteres, y demostraron que el total de las once variantes se debía a once alelos mutantes, cada uno de un locus cromosómico distinto. Cruzaron entre sí líneas puras de cada uno de los fenotipos para generar F_1 dihíbridas, que posteriormente se sometieron a cruzamientos de prueba. Los cruzamientos de prueba revelaron la serie de cuatro grupos de ligamiento que se muestra en la Figura 5-11*b*. Observe que los loci *ye* y *cw* aparecen provisionalmente ligados, aunque la frecuencia de recombinación no es significativamente menor del 50%.

Un análisis de ligamiento como el precedente no sirve para asignar grupos de ligamiento a cromosomas concretos; esto debe hacerse mediante la utilización de técnicas de citogenética que trataremos en el Capítulo 17. En el presente ejemplo, dichas técnicas citogenéticas han permitido relacionar los grupos de ligamiento con los cromosomas numerados previamente, como se muestra en la Figura 5-11*b*.

El cruzamiento de tres puntos

Hasta ahora, hemos estudiado el ligamiento en cruzamientos de dobles heterocigotos con dobles homocigotos recesivos. El siguiente nivel de complejidad es un cruzamiento entre un triple heterocigoto y un triple homocigoto. Este tipo de cruzamiento, llamado **cruzamiento de tres puntos**, ilustra sobre el tipo común de estrategia que se utiliza en el análisis de ligamiento. Vamos a ver dos ejemplos de tales cruzamientos.

En primer lugar, nos centraremos en tres genes de *Drosophila* cuyos alelos no silvestres son *sc* (*scute*, pérdida de algunas cerdas torácicas), *ec* (*echinus*, superficie ocular rugosa) y *vg* (*vestigial*, alas cortas). Podemos cruzar moscas triples homocigotas recesivas $sc/sc \cdot ec/ec \cdot vg/vg$ con moscas silvestres para generar el triple heterocigoto $sc/sc^+ \cdot ec/ec^+ \cdot vg/vg^+$. Una vez obtenido, analizaremos la recombinación sometiendo hembras triples heterocigotas a cruzamiento de prueba con machos triples homocigotos recesivos. A continuación, se muestran los resultados de este cruzamiento de prueba. La descendencia se indica con los genotipos gaméticos que derivan de las hembras heterocigóticas.

Tenemos ocho tipos de gametos distintos que, en una muestra de 1008 moscas, aparecen en los números siguientes:

$sc \cdot ec \cdot vg$	235
$sc^+ \cdot ec^+ \cdot vg^+$	241
$sc \cdot ec \cdot vg^+$	243
$sc^+ \cdot ec^+ \cdot vg$	233
$sc \cdot ec^+ \cdot vg$	12
$sc^+ \cdot ec \cdot vg^+$	14
$sc \cdot ec^+ \cdot vg^+$	14
$sc^+ \cdot ec \cdot vg$	16
	1008

La forma sistemática de analizar estos cruzamientos consiste en hacer el cálculo de todas las posibles frecuencias de recombinación. Sin embargo, antes de hacerlo, siempre merece la pena inspeccionar los datos para intentar extraer alguna conclusión obvia. A primera vista, podemos observar una importante desviación de la proporción 1:1:1:1:1:1:1:1, que sería la esperada si no hubiera ligamiento entre los tres genes. Una vez hecha esta observación, comencemos a calcular los valores de las frecuencias de recombinación, tomando cada vez una pareja de genes. Empezando con los loci *sc* y *ec* (ignoramos, de momento, el locus *vg*), determinamos qué genotipos gaméticos son recombinantes para *sc* y *ec*. Puesto que los heterocigotos se formaron con gametos $sc \cdot ec$ y $sc^+ \cdot ec^+$, sabemos que los productos recombinantes de la meiosis deben ser $sc \cdot ec^+$ y $sc^+ \cdot ec$. En la lista, se observa que hay 12 + 14 + 14 + 16 = 56 individuos de estas clases; y, por lo tanto, RF = (56/1008) × 100 = 5.5 m.u. Esta frecuencia nos dice que los dos loci deben estar ligados en el mismo cromosoma, de la siguiente manera:



Veamos ahora la recombinación entre los loci *sc* y *vg*. Los genotipos parentales de entrada fueron *sc vg* y $sc^+ vg^+$, de forma que debemos calcular las frecuencias de los descendientes de tipo $sc\ vg^+$ y $sc^+ vg$ (en esta ocasión, ignoramos *ec*). Observamos que hay 243 + 233 + 14 + 16 = 506 recombinantes; y, puesto que 506/1008 es un valor de RF muy cercano al 50%, concluimos que los loci *sc* y *vg* no están ligados y, probablemente, se hallan en cromosomas distintos. Podemos resumir estas relaciones de ligamiento de la siguiente manera:



Una conclusión evidente es que los loci *ec* y *vg* tampoco deben estar ligados. Hecho que podría confirmarse obteniendo el número de recombinantes y calculando la RF (pruebe a hacerlo). Una vez hechas estas deducciones sobre el ligamiento, podemos reescribir el genotipo de los parentales del cruzamiento de prueba como $sc^+\ ec^+/sc\ ec\ ;\ vg^+/vg \times sc\ ec/sc\ ec\ ;\ vg/vg$.

Un segundo ejemplo, en el que utilizaremos otros loci de *Drosophila*, nos permitirá introducir algunos conceptos genéticos de gran importancia. En este caso, los alelos no silvestres son *v* (*vermilion*, ojos bermellones), *cv* (*crossveinless*, ausencia de

[ven]as que cruzan el ala conectando las venas principales) y *ct* (*cut*, [bo]rdes de las alas dentados). Esta vez, las estirpes parentales son moscas dobles homocigotas recesivas de genotipo $v^+/v^+ \cdot cv/cv \cdot ct/ct$ y moscas homocigotas recesivas para un solo locus de genotipo $v/v \cdot cv^+/cv^+ \cdot ct^+/ct^+$. De este cruzamiento, se obtiene una descendencia triple heterocigótica, de genotipo $v/v^+ \cdot cv/cv^+ \cdot ct/ct^+$, y hembras de este genotipo se someten a cruzamiento de prueba con machos triples homocigotos de genotipo $v/v \cdot cv/cv \cdot ct/ct$. Los genotipos gaméticos de las hembras, que determinan las ocho clases que aparecen entre la descendencia de este cruzamiento de prueba, se indican a continuación junto a sus números respectivos, siendo 1448 el número total de moscas:

$v \cdot cv^+ \cdot ct^+$	580
$v^+ \cdot cv \cdot ct$	592
$v \cdot cv \cdot ct^+$	45
$v^+ \cdot cv^+ \cdot ct$	40
$v \cdot cv \cdot ct$	89
$v^+ \cdot cv^+ \cdot ct^+$	94
$v \cdot cv^+ \cdot ct$	3
$v^+ \cdot cv \cdot ct^+$	5
	1448

Una vez más, debemos utilizar el procedimiento habitual para analizar la recombinación, si bien debemos ser cuidadosos en la clasificación que hagamos de las clases parentales y recombinantes. Observe que los genotipos parentales de entrada para los triples heterocigotos son $v^+ \cdot cv \cdot ct$ y $v \cdot cv^+ \cdot ct^+$; y debemos tener esto en cuenta a la hora de decidir cuáles son los recombinantes.

Comenzando con los loci *v* y *cv*, vemos que los recombinantes son de genotipo $v \cdot cv$ y $v^+ \cdot cv^+$, y que de éstos hay 45 + 40 + 89 + + 94 = 268. Entre un total de 1448 moscas, este número supone una RF del 18.5 %.

Para los loci *v* y *ct*, los recombinantes con $v \cdot ct$ y $v^+ \cdot ct^+$. Hay 89 + 94 + 3 + 5 = 191 de estos recombinantes entre las 1448 moscas, así que la RF = 13.2 %.

Para *ct* y *cv*, los recombinantes son $cv \cdot ct^+$ y $cv^+ \cdot ct$, de los que hay 45 + 40 + 3 + 5 = 93 entre las 1448 moscas, de manera que la RF = 6.4 %.

Los tres genes están ligados al mismo cromosoma, puesto que los valores de RF son considerablemente menores del 50 %. Teniendo en cuenta que la RF más elevada es la que se detecta entre los loci *v* y *cv*, éstos deben ser los que están más alejados: y, por lo tanto, el locus *ct* debe estar entre ellos. Podemos dibujar el mapa siguiente:

$$v \quad \longleftarrow 13.2 \text{ m.u.} \longrightarrow \quad ct \quad \longleftarrow 6.4 \text{ m.u.} \longrightarrow \quad cv$$

El cruzamiento de prueba se puede reescribir como $v^+\ ct\ cv/v\ ct^+\ cv^+ \times v\ ct\ cv/v\ ct\ cv$.

Observe varios puntos importantes que hay que considerar. En primer lugar, el orden que se deduce para los tres genes es diferente del que se ve en la lista de los genotipos en la descendencia. Puesto que el objetivo del ejercicio era determinar las relaciones de ligamiento entre estos genes, la lista original tenía que ser necesariamente arbitraria. Simplemente, no conocíamos el orden de los genes antes de analizar los datos.

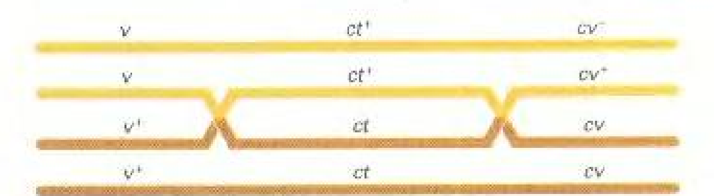


Figura 5-12. Ejemplo de entrecruzamiento doble. Observe que se producen cromátidas dobles recombinantes que tienen las combinaciones alélicas parentales para los loci externos.

En segundo lugar, hemos establecido definitivamente que *ct* está entre *v* y *cv*, y las distancias en unidades de mapa entre *ct* y estos dos loci. Sin embargo, la colocación de *v* a la izquierda y *cv* a la derecha ha sido arbitraria. De igual manera, podríamos haber invertido el mapa.

Un tercer aspecto a destacar es que las dos distancias de mapa más pequeñas, 13.2 m.u. y 6.4 m.u., suman 19.6 m.u., que es una distancia mayor que la de 18.5 m.u. calculada entre *v* y *cv*. ¿A qué se debe esto? La respuesta a esta pregunta está en cómo hemos analizado las dos clases más raras en nuestra clasificación de recombinantes entre los loci *v* y *cv*. Ahora que tenemos el mapa, podemos observar que estas dos clases menos frecuentes corresponden en realidad a recombinantes dobles, que proceden de dos entrecruzamientos (Fig. 5-12). Sin embargo, no tuvimos en cuenta los genotipos $v\ ct\ cv^+$ y $v^+\ ct^+\ cv$ cuando calculamos el valor de la RF entre *v* y *cv*; ya que, después de todo, esas son combinaciones parentales respecto de *v* y *cv* ($v\ cv^+$ y $v^+\ cv$). No obstante, a la vista del mapa, observamos que esto lleva a una estima a la baja de las distancias entre los loci *v* y *cv*. No sólo debíamos haber contado las dos clases más raras, sino que deberíamos haberlas contado dos veces, ya que cada una de ellas corresponde a una clase de recombinantes dobles.

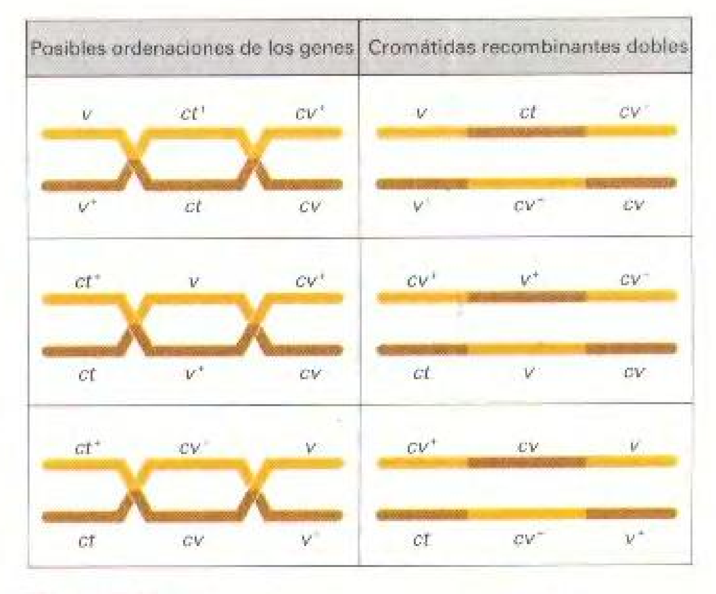


Figura 5-13. Sólo hay tres posibles maneras de ordenar tres genes. En cada una de ellas, un entrecruzamiento doble genera un genotipo doble recombinante único. Sólo la primera de las ordenaciones es compatible con los datos del texto.

Por tanto, podemos corregir el valor sumando los números 45 + + 40 + 89 + 94 + 3 + 3 + 5 + 5 = 284. Entre un total de 1448 moscas, este número corresponde exactamente al 19.6 %, que es idéntico a la suma de las dos distancias intermedias.

Una vez hemos adquirido cierta experiencia con los datos de este cruzamiento, podemos volver a la lista de la descendencia y comprobar que, por lo general, es posible deducir el orden de los genes mediante una simple inspección de los datos, sin necesidad de calcular las frecuencias de recombinación. Únicamente son posibles tres ordenaciones distintas, cada una con un gen diferente en la posición intermedia. Normalmente, se cumple que las clases menos numerosas son las de los dobles recombinantes; y tan sólo una de las ordenaciones debería ser compatible con la formación de estas clases más raras por doble entrecruzamiento. Como se muestra en la Figura 5-13, sólo hay un orden que puede producir recombinantes dobles de genotipo *v ct* cv^+ y v^+ ct^+ *cv*. Observe, de paso, que la capacidad para detectar un entrecruzamiento doble pasa por disponer de un gen en heterocigosis entre los dos sitios de entrecruzamiento; si las hembras progenitoras no hubieran sido heterocigotas ct/ct^+, nunca habríamos identificado las clases de los recombinantes dobles.

Finalmente, dése cuenta que los mapas de ligamiento sitúan a unos loci en relación con otros, separados por distancias en unidades de mapa normalizadas. En realidad, no sabemos en qué sitios del cromosoma están esos loci, ni siquiera en qué cromosoma concreto se encuentran. En esencia, el mapa de ligamiento es una abstracción que, como veremos en el Capítulo 17, podemos correlacionar con un cromosoma determinado, y con regiones concretas dentro de él, únicamente cuando aplicamos procedimientos especiales de análisis citogenético.

COROLARIO

Los cruzamientos de prueba de tres (o más) puntos permiten averiguar las relaciones de ligamiento entre tres (o más) genes en un solo experimento.

Interferencia

La detección de las clases de recombinantes dobles demuestra que los entrecruzamientos dobles deben ocurrir. Sabiendo esto, nos podemos preguntar si los entrecruzamientos en regiones cromosómicas adyacentes son independientes o si, por el contrario, un entrecruzamiento en una región afecta a la probabilidad de que se produzca otro en un sitio cercano. Resulta que, a menudo, los entrecruzamientos no son independientes unos de otros y esta interacción recibe el nombre de **interferencia**.

Podemos analizar este fenómeno empleando el siguiente razonamiento. Si los entrecruzamientos en dos sitios distintos fueran independientes, de acuerdo con la regla del producto (véase la pág. 37), la frecuencia de recombinantes dobles debería ser igual al producto de las frecuencias de recombinantes en las dos regiones adyacentes. En los datos de recombinación con *v–ct–cv*, el valor de la RF para *v–ct* es 0.132 y para *ct–cv* es 0.064, de forma que los recombinantes dobles deberían aparecer, en caso de independencia, con una frecuencia de 0.132 × 0.064 = 0.0084 (0.84 %). En la muestra de 1448 moscas, se esperaría la aparición de 0.0084 × 1448 = 12 recombinantes dobles. Sin embarg[o] los datos indican que, en realidad, tan sólo se observaron 8. Si es[te] déficit en el número de recombinantes dobles se repitiera de for[ma] consistente, concluiríamos que las dos regiones no son indep[en]dientes y que en la distribución de los entrecruzamientos, los he[chos] únicos se ven favorecidos sobre los dobles. En otras palabr[as] se produce algún tipo de *interferencia*: un entrecruzamiento redu[ce] la probabilidad de que tenga lugar otro en la región adyacent[e].

La interferencia se cuantifica calculando primero un valor d[e]nominado **coeficiente de coincidencia (c.o.c.)**, que es el cocie[n]te entre los dobles recombinantes observados y los esperados [y] restándole a 1 este valor. Por tanto

Interferencia (I) = 1 − c.o.c. =

$$= 1 - \left[\frac{\text{frecuencia o número de recombinantes dobles observados}}{\text{frecuencia o número de recombinantes dobles esperados}}\right]$$

en nuestro ejemplo

$$I = 1 - \tfrac{8}{12} = \tfrac{4}{12} = \tfrac{1}{3}, \text{ ó } 33\,\%$$

En algunas regiones, nunca se observan recombinantes d[o]bles. En estos casos, c.o.c. = 0 e I = 1, de manera que la interf[e]rencia es completa. La mayoría de las veces, los valores de inte[r]ferencia que se observan al cartografiar loci cromosómicos es[tán] entre 0 y 1. No obstante, en algunas situaciones especiales apar[e]cen interferencias negativas, al observarse un número de recom[]binantes dobles que excede al esperado.

Los cruzamientos de prueba de tres puntos, y otras versio[nes] más complejas de los mismos, tienen una importancia tan fund[a]mental en el análisis de la recombinación que merece la pe[na] hacer un resumen paso a paso de este tipo de estudios, finaliza[n]do con el cálculo de la interferencia. Utilizaremos los valo[res] numéricos del cruzamiento con los loci *v*, *ct* y *cv*.

1. Cálculo de las frecuencias de recombinación entre cada p[ar] de genes:

$$v - cv = 18.5\,\%$$
$$cv - ct = 6.4\,\%$$
$$ct - v = 13.2\,\%$$

2. Representación de las relaciones de ligamiento en un map[a]

v ——— *ct* ——— *cv*

← 13.2 m.u. → ← 6.4 m.u. →

3. Determinación de las clases de recombiantes dobles.

4. Cálculo de la frecuencia o número de recombinantes dob[les] esperados en caso de que no hubiera interferencia:

Frecuencia esperada = 0.132 × 0.064 = 0.0084

Número esperado = 0.0084 × 1448 = 12

5. Cálculo de la interferencia:

Número observado de recombinantes dobles = 8

Número esperado de recombinantes dobles = 12

$$I = 1 - \tfrac{8}{12} = \tfrac{4}{12} = 0.33 \text{ ó } 33\,\%$$

CUADRO 5-2. Valores de RF (porcentaje) correspondientes a valores seleccionados de *z* en cruzamientos de dihíbridos en fase de repulsión

z	RF
0.001	2.2
0.005	4.9
0.020	9.9
0.040	13.8
0.100	21.1
0.200	28.5
0.300	33.5
0.500	40.3
0.700	45.0

Una pregunta que cabe hacerse es por qué en nuestros ejemplos de ligamiento en *Drosophila* utilizamos siempre hembras heterocigóticas en los cruzamientos de prueba. Cuando se cruzan machos $pr\ vg/pr^+\ vg^+$ con hembras $pr\ vg/pr\ vg$, únicamente se recuperan descendientes $pr\ vg/pr^+\ vg^+$ y $pr\ vg/pr\ vg$. Este resultado demuestra que no se producen entrecruzamientos en los machos de *Drosophila*. Sin embargo, esta ausencia de entrecruzamiento en uno de los sexos se limita a algunas especies, y no es el caso para los machos de todas las especies (o para el sexo heterogamético). En otros organismos, se producen entrecruzamientos en los machos XY y en las hembras WZ. La causa de la ausencia de entrecruzamientos en los machos de *Drosophila* está en su inusual profase I, en la que no se forman complejos sinaptonémicos.

Cabe decir que también hay una diferencia entre los sexos humanos en cuanto a la recombinación. Las mujeres muestran frecuencias de recombinación más altas que los hombres para el mismo loci.

Cálculo de las frecuencias de recombinación en cruzamientos dihíbridos

La vía más adecuada para calcular la frecuencia de recombinación es la del cruzamiento de prueba. Sin embargo, en la práctica, no siempre está disponible el homocigoto recesivo apropiado. Una situación bastante común es la identificación de un nuevo fenotipo que, mediante análisis mendeliano, se demuestra que está producido por cierto genotipo *a/a*. Para localizar este nuevo locus en el mapa genético, el individuo *a/a* se cruza con otros genotipos como el *b/b*, donde ya conocemos la posición en el mapa del locus *B*. En esta situación, se puede observar que no hay ningún homocigoto recesivo disponible. De hecho, el genotipo *a/a* · *b/b* se puede obtener únicamente mediante cruzamientos adicionales.

No obstante, resulta posible calcular las frecuencias de recombinación a partir del cruzamiento de los dobles heterocigotos que se forman al cruzar las dos estirpes. En este ejemplo, los parentales serían *a/a* · *B/B* y *A/A* · *b/b*, y *A/a* · *B/b* el dihíbrido. Este doble heterocigoto producirá gametos parentales *a* · *B* y *A* · *b*, y gametos recombinantes *A* · *B* y *a* · *b*. En el cruzamiento dihíbrido, los gametos se fusionarán al azar e, inicialmente, no parece posible reconocer los recombinantes entre la descendencia. Sin embargo, la descendencia *a/a* · *b/b* nos sirve de gran ayuda, ya que es el único genotipo que *debe* haberse formado con gametos recombinantes —de hecho, con la fertilización de un gameto *a* · *b* con otro *a* · *b*. Por lo tanto, si la frecuencia de los productos meióticos *a* · *b* es *p*, la frecuencia de la descendencia *a/a* · *b/b* será p^2. En consecuencia, para hallar el valor de *p* simplemente tenemos que hacer la raíz cuadrada de la frecuencia de la descendencia *a/a* · *b/b*. Puesto que sabemos que la frecuencia de *a* · *b* debe ser igual a la de *A* · *B*, podemos duplicar *p* para obtener la frecuencia de recombinación total.

Si los dos genes no están ligados, sabemos que la clase *a/a* · *b/b* se formará con una frecuencia de $\frac{1}{16}$ (el «1» de la proporción 9:3:3:1). En este caso, la raíz cuadrada de $\frac{1}{16}$ es $\frac{1}{4}$; y, duplicando este valor *p*, obtendríamos una RF de $\frac{1}{2}$, ó 50 %, como se esperaba. ¿Qué ocurre en caso de ligamiento? Las situaciones de ligamiento producirán frecuencias de *a b/a b* significativamente menores de $\frac{1}{16}$. Supongamos que obtenemos una frecuencia de *a b/a b* igual a 0.01 (1 %); la frecuencia de los productos meióticos *a b* debe haber sido 0.1, ó 10 %, con lo que obtenemos una RF del 20 %, un caso evidente de ligamiento. Observe también que, si quisiéramos calcular las frecuencias de los genotipos parentales, éstas deberían ser del 40 % para cada uno de ellos, *a B* y *A b*, calculadas como la mitad de 100 − 20 %.

El método que acabamos de ver es teóricamente correcto, pero en la práctica es poco preciso, debido a que se extrapola de sólo uno de los fenotipos de la F_2 y, además, incluye una raíz cuadrada. Se ha ideado un método más adecuado que incorpora todos los fenotipos de la F_2. Se calcula un valor denominado *razón del producto* (*z*) y la frecuencia de recombinación se obtiene a partir de unas tablas de valores de *z*. En el dihíbrido en fase de repulsión mencionado anteriormente (*A b/a B*), la razón del producto se calcula como sigue, donde los cuatro componentes del cálculo son los cuatro fenotipos de la F_2:

$$z = \frac{(A/-\ B/-) \times (a/a\ \ b/b)}{(A/-\ b/b) \times (a/a\ \ B/-)}$$

(**Nota:** para abreviar, la fórmula no se ha escrito utilizando los símbolos de ligamiento.) El Cuadro 5-2 muestra los valores de RF que corresponden a valores seleccionados de *z*. Existen programas de ordenador que calculan los valores de RF a partir de los datos disponibles de la F_2.

COROLARIO

La frecuencia de recombinación se puede calcular de modo indirecto a partir de la descendencia de cruzamientos dihíbridos.

Ejemplos de mapas de ligamiento

Los mapas de ligamiento constituyen un aspecto esencial del estudio genético experimental de cualquier organismo. Son el preludio de todo intento serio de manipulación genética. ¿Por qué la cartografía genética es tan importante? Los tipos de genes que un organismo posee y sus posiciones en los cromosomas son aspectos fundamentales del análisis genético. Las razones principales para confeccionar los mapas genéticos tienen que ver

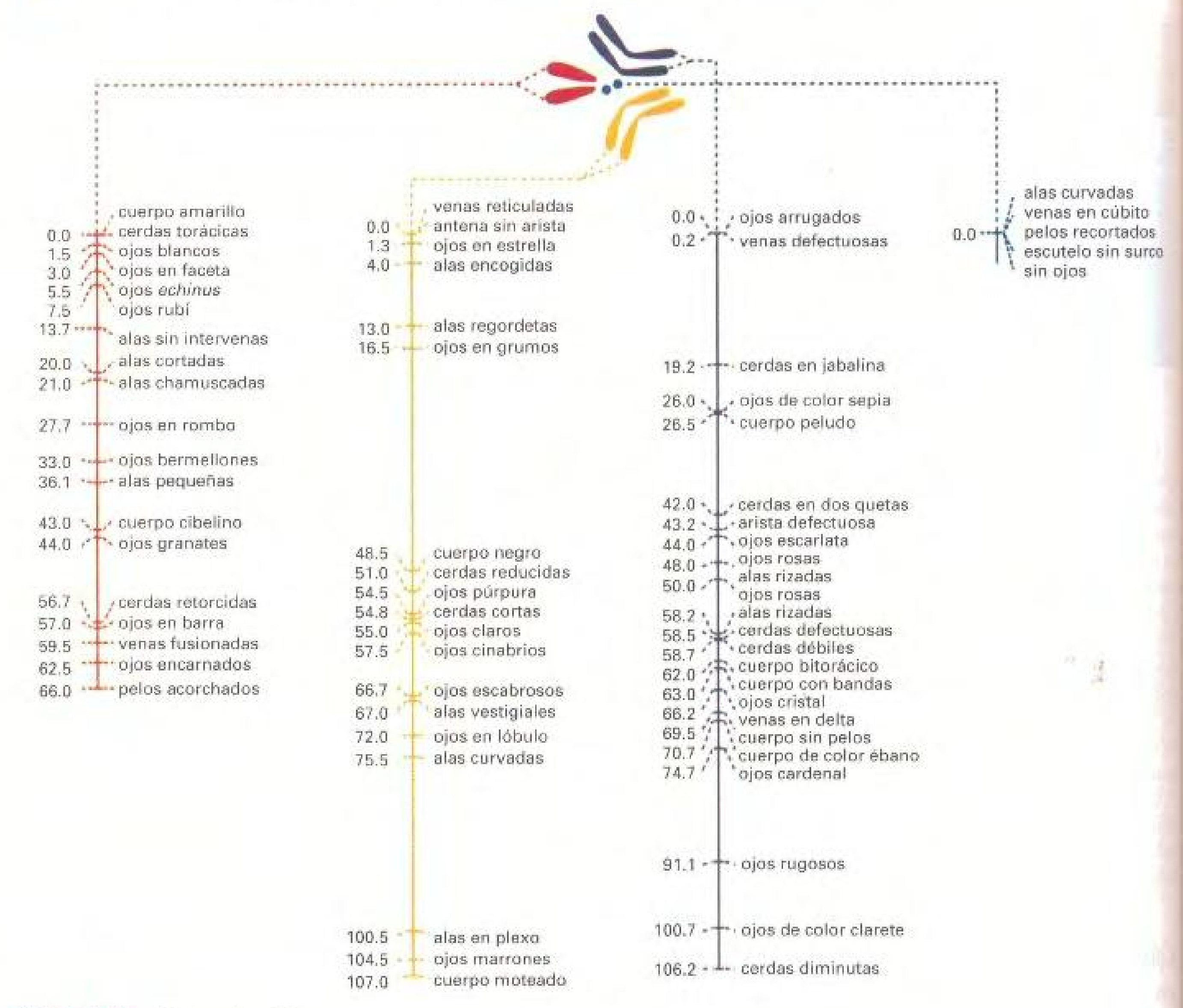
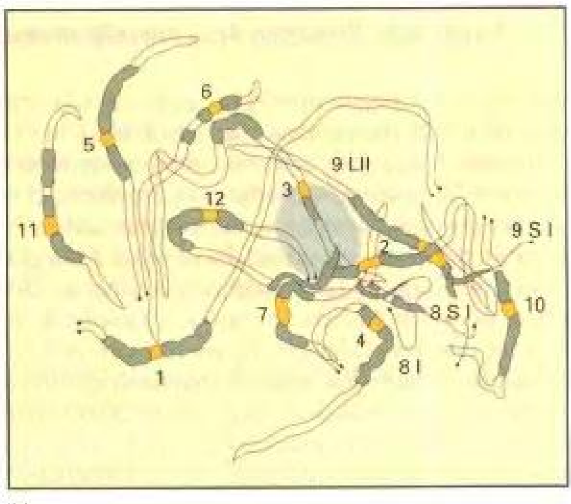


Figura 5-14. Mapa genético del genoma de *Dosophila* que muestra algunos de los loci y cómo cada uno de ellos corresponde a un par de cromosomas homólogos. Las distancias se dan en unidades de mapa a partir del gen más próximo a un extremo. Los valores más altos se han calculado mediante la suma de los intervalos más cortos, ya que la frecuencia de recombinación entre dos loci no puede ser mayor del 50 %. (Tomado de E. W. Sinnott, L. C. Dunn y T. Dobzhansky, *Principles of Genetics*, 5.ª ed. Copyright © 1962 de McGraw-Hill.)

Figura 5-15. Cartografía de los cromosomas del tomate. (a) Microfotografía de una profase I meiótica (paquitene) de anteras, en la que se observa el aspecto con el microscopio de los 12 pares de cromosomas. (b) Sistema de numeración de los cromosomas que se utiliza en la actualidad. (c) Mapa de ligamiento realizado en 1952, en el que se muestran los grupos de ligamiento conocidos entonces. Junto a cada locus aparece un dibujo de la variante fenotípica que permitió la identificación de dicho locus génico por primera vez (a la derecha) y otro dibujo del fenotipo normal correspondiente (a la izquierda). Las distancias entre los loci se indican en unidades de mapa. (Partes a y b tomadas de C. M. Rick, «The tomato.» Copyright © 1978 de Scientific American Inc. Reservados todos los derechos. Parte c tomada de L. A. Butler.)



(a)



6
5
9 LII
3
12
11
9 S I
2
7
8 S I
10
4
8 I
1

(b)

1
Normal (M) 12 Moteado (m)
Alto (D) 4 Enano (d)
Liso (P) 17 Melocotón (p)
Normal (O) Oblongo (o)
16
Lanoso (Wo/wo) Normal (wo)
Normal (Ne) 5 4 Necrótico (ne)
6
Inflorescencia simple (S) Inflorescencia compuesta (s)
No picudo (Bk) 14 Picudo (bk)
Pocos lóculos (Lc) Muchos lóculos (lc)

2
Rojo (R) 15 Amarillo (r)
Amarilla (Wf) Blanca (wf)

3
Normal (Br) 30 Braquítico (br)
Piel amarilla (Y) 35 Piel clara (y)
Resistencia al moho de la hoja (Cfsc) Sensibilidad al moho de la hoja (cfsc)

4
Hoja hendida (C) Hoja tipo patata (c)
12
Indeterminado (Sp) Determinado (sp)
33
Resistencia al moho de la hoja de tipo 1 (Cfp1) Sensibilidad al moho de la hoja de tipo 1 (cfp1)

5
Normal (F) 23 Fasciado (f)
Púrpura (A) 18 Verde (a)
Peludo (Hl) Sin pelos (hl)
20
Normal (Lf) 2 16 Con hojas (lf)
Con unión (J) Sin unión (j)
30
Sensibilidad al moho de la hoja de tipo 2 (cfp2) Resistencia al moho de la hoja de tipo 2 (Cfp2)
No marchita (W) 35 Marchita (w)
Normal (Nt) Punta en pezón (nt)

6
Verde (L) 27 Verde amarillento (l)
Normal (Bu) Arbustivo (bu)

7
Base verde (U) 23 Fruto uniforme (u)
Liso (H) 21 Peludo (h)
No clementino (T) 30 Clementino (t)
Xantofila (Xa/xa) Verde (xa)

8
Tallo púrpura (Al) Sin antocianina (al)

9
Enano extendido (Dm) Modificador de enano compacto (dm)

10
Cotiledones anchos (Nc) Cotiledones estrechos (nc)

11
Normal (B) Ancho (b)

12
Normal (Mc) Macrocáliz (mc)

(c)

con la *función, evolución* y *aislamiento* de los genes. Se sabe que la posición de un gen afecta, en numerosas ocasiones, a su expresión, un fenómeno que suele conocerse como «efecto de posición». Genes con funciones relacionadas están a menudo agrupados en los cromosomas bacterianos, normalmente debido a que se transcriben como una sola unidad. La posición de un gen eucariótico en una región de heterocromatina o cerca de ella puede afectar su expresión. El conocimiento de la posición de un gen es útil en los estudios evolutivos, ya que podemos deducir las reorganizaciones cromosómicas que se producen en el curso de la evolución a través del análisis de las posiciones relativas de los mismos genes en organismos relacionados. Finalmente, si se pretende aislar un gen para su análisis molecular, el conocimiento de su posición cromosómica representa a menudo el comienzo del procedimiento de aislamiento (clonación posicional, véase el Cap. 12). Son muchos los organismos en los que disponemos de mapas genéticos bastante completos. Los mapas obtenidos son el resultado de una enorme labor de análisis genético, llevada a cabo mediante la colaboración de grupos de investigación distribuidos por todo el mundo. Las Figuras 5-14 y 5-15 muestran dos ejemplos de mapas de ligamiento: uno de *Drosophila* y el otro del tomate. El genoma de *Drosophila* es uno de los que se ha cartografiado con mayor detalle de todos los organismos modelo. El mapa de la Figura 5-14 muestra tan sólo una fracción de los loci conocidos. Observe que los loci de funciones conocidas (p. ej., los del color de los ojos) están dispersos por todo el mapa. También el tomate es interesante, tanto desde el punto de vista de la investigación básica como aplicada, y el genoma del tomate es uno de los mejor cartografiados de las plantas.

Los diferentes paneles de la Figura 5-15 ilustran algunas de las fases de conocimiento a través de las cuales la investigación llega a establecer un mapa completo. En primer lugar, aunque los cromosomas son visibles con el microscopio, inicialmente no hay forma de localizar los genes en ellos. Sin embargo, los cromosomas pueden ser identificados individualmente y numerados, en base a ciertos marcadores propios como los patrones de tinción o la posición del centrómero, hecho indicado en los paneles *a* y *b* de la Figura 5-15. A continuación, el análisis de las frecuencias de recombinación genera una serie de grupos de ligamiento que deben corresponder a los cromosomas, si bien no pueden establecerse necesariamente correlaciones específicas con cada cromosoma numerado. En algún momento, como vimos en el ejemplo de la mosca *Cochliomyia hominivorax*, los análisis citogenéticos permiten asignar los grupos de ligamiento a cromosomas concretos. La Figura 5-15*c* muestra un mapa del tomate elaborado en 1952, con las relaciones de ligamiento entre genes que se conocían en la época. Cada locus está representado por los dos alelos utilizados en los experimentos de cartografía originales. Conforme se fueron conociendo más loci, se cartografiaron en relación a los loci mostrados en la Figura 5-15*c*, de manera que el mapa contiene en la actualidad cientos de loci. Algunos de los números cromosómicos indicados en la figura son provisionales y no se corresponden con el sistema actual de numeración de los cromosomas. Observe de nuevo que genes con funciones relacionadas (p. ej., la forma del fruto) estás dispersos.

Prueba de χ^2 en el análisis de ligamiento

Cuando los valores de la RF están próximos al 50 %, se puede utilizar la prueba de χ^2 para establecer la existencia de ligamiento. Supongamos que hemos cruzado dos parentales homocigóticos de genotipos *A/A · B/B* y *a/a · b/b*, obteniéndose el dihíbrido *A/a · B/b*, que hemos sometido a un cruzamiento de prueba con *a/a · b/b*. Se obtiene una descendencia de 500 individuos que hemos clasificado de la siguiente manera (indicada en función de los gametos producidos por el dihíbrido):

140	*A · B*
135	*a · b*
110	*A · b*
115	*a · B*

A partir de estos datos, obtenemos una frecuencia de recombinación de 225/500 = 45 %. Esto parece un caso de ligamiento, puesto que la RF es menor del 50 % que se espera de la segregación independiente. Sin embargo, es posible que las dos clases recombinantes sean ligeramente minoritarias debido tan sólo al azar; por lo tanto, necesitamos realizar la prueba de χ^2.

El problema estriba en determinar los valores esperados, *E*, para cada una de las clases. Para comprobar la existencia de ligamiento, podríamos suponer que los valores esperados vienen dados simplemente por la proporción 1:1:1:1 de las cuatro clases que se obtienen en el cruzamiento de prueba cuando hay segregación independiente. Entre la descendencia de 500 individuos de nuestro ejemplo, esperaríamos 500/4 = 125 para cada clase. No obstante, la proporción 1:1:1:1 no constituye el mejor test para determinar ligamiento, ya que para obtenerla deben ser

CUADRO 5-3. Tabla de contingencia que compara los resultados observados y los esperados de un cruzamiento de prueba realizado para examinar el ligamiento entre los loci *A/a* y *B/b*

LOCUS 2:	*B*		*b*		
	O	*E*	*O*	*E*	Total
LOCUS 1					
A	140	255 × 250/500 = 127.5	110	245 × 250/500 = 122.5	250
a	115	255 × 250/500 = 127.5	135	245 × 250/500 = 122.5	250
Total	255		245		500

ciertos dos aspectos. Debe haber segregación independiente de los locus *A* y *B*; y, además, debe haber igual probabilidad de que se formen los distintos genotipos durante la fertilización y de que alcancen la edad a la que son examinados, lo que generalmente significa que los cuatro genotipos deben tener igual probabilidad de sobrevivir desde el cigoto a la edad adulta. Sin embargo, es frecuente que las mutaciones que se utilizan en el análisis de ligamiento tengan algún efecto deletéreo en el homocigoto; de manera que los genotipos *a/a* o *b/b* tienen una probabilidad de supervivencia menor que los heterocigotos *A/a* y *B/b* de fenotipo silvestre. Esto podría llevarnos a rechazar la hipótesis de segregación independiente, incluso cuando fuera correcta, puesto que las diferencias en la supervivencia de los genotipos causarían desviaciones de la proporción 1:1:1:1 esperada. Lo que se requiere es un método de calcular los valores esperados, *E*, que no dependa de las diferencias en la supervivencia.

No importa con qué frecuencia aparezcan los genotipos *a/a* y *b/b* entre los adultos del cruzamiento de prueba, si hay segregación independiente, esperamos que la frecuencia de los gametos de genotipo *a* · *b* sea el producto de las frecuencias de los alelos *a* y *b*. En nuestro ejemplo, la proporción total de alelos *a* es (135 + 115)/500, que es de hecho el 50 % esperado, pero la frecuencia del alelo *b* es únicamente (135 + 110)/500 = 49 %. De esta manera, esperamos que la *frecuencia* del genotipo *a* · *b* sea 0.50 × 0.49 = 0.245 y el *número* de genotipos *a* · *b* en una muestra de 500 sea 500 × 0.245 = 122.5. Se puede realizar el mismo tipo de cálculo para cada uno de los genotipos y, así, obtener los valores esperados. La comparación se hace generalmente en una **tabla de contingencia**, como se muestra en la Cuadro 5-3. El valor esperado en una entrada de la tabla de contingencia es el producto de la frecuencia que se observa en su fila, la frecuencia que aparece en su columna y el tamaño total de la muestra. Como las frecuencias de las filas y las columnas son el número total en las filas o en las columnas dividido por el total de la muestra, el cálculo del valor esperado en cada entrada consiste simplemente en multiplicar los valores totales de su fila y de su columna para dividir el número obtenido por el total de la muestra. El valor de χ^2 se calcula como sigue:

Clase	*O*	*E*	*O* − *E*	$(O-E)^2/E$
A · *B*	140	127.5	12.5	1.23
A · *b*	110	122.5	−12.5	1.28
a · *B*	115	127.5	−12.5	1.23
a · *b*	135	122.5	12.5	1.28
			Total χ^2 =	5.02

El valor de χ^2 obtenido se convierte en una probabilidad empleando una tabla de χ^2 (véase el Cuadro 4-1, pág. 126). Para hacer esto, necesitamos determinar el número de grados de libertad (df) en la prueba. Dicho número, como sugiere su propio nombre, es el número de desviaciones independientes de los valores observados respecto a los esperados. Se observa que, debido a la forma de cálculo de los valores esperados en la tabla de contingencia a partir de los totales de las filas y las columnas, todas las desviaciones son idénticas en número absoluto, 12.5, y alternan en su signo, de manera que la suma de todas es cero. Así, en realidad, tan sólo hay una desviación independiente, de manera que tenemos un único grado de libertad. Por lo tanto, siguiendo la línea para un grado de libertad en el Cuadro 4-1, vemos que la probabilidad de obtener una desviación tan grande (o mayor) de los valores esperados sólo por efecto del azar es 0.025 (2.5 %). Puesto que esta probabilidad es menor del 5 %, la hipótesis de segregación independiente debe rechazarse. Una vez rechazada la hipótesis de ausencia de ligamiento, inferimos que los loci deben estar ligados.

Cartografía genética con marcadores moleculares

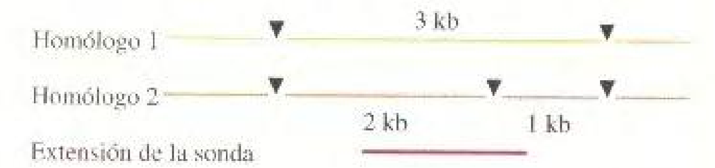
Durante los primeros 70 años de la cartografía genética, los marcadores disponibles en los mapas eran genes con variantes alélicas que producían fenotipos diferentes. A medida que aumentó nuestro conocimiento sobre la genética de los organismos, mayor fue el número de genes que se podían utilizar como marcadores. Sin embargo, incluso en los organismos cuyos mapas parecían estar «llenos» de loci de efecto fenotípico conocido, se demostró que los intervalos cromosómicos entre los genes debían contener enormes cantidades de DNA. Estos intervalos no se pudieron caracterizar mediante análisis de ligamiento, ya que se carecía de marcadores en dichas regiones. Para la obtención de mapas de mayor resolución, era preciso disponer de un gran número de marcadores genéticos adicionales que permitieran rellenar los huecos existentes. Esto se resolvió con el descubrimiento de varios tipos de marcadores moleculares. Un **marcador molecular** es un sitio en el que hay heterocigosis para algún tipo de variación neutra en el DNA; esto es, que no está asociada a ninguna variación fenotípica observable. Cuando se encuentra en heterocigosis, este «locus de DNA» puede utilizarse en la cartografía genética al igual que cualquier par de alelos convencional. Como los marcadores moleculares se pueden detectar fácilmente y son muy numerosos en el genoma, permiten llenar los huecos entre los genes de fenotipo conocido cuando se sitúan en el mapa mediante análisis de ligamiento. Observe que, para la cartografía genética, el significado biológico del marcador molecular no es importante en sí mismo; el sitio de heterocigosis es simplemente un punto conveniente de referencia que será útil para orientarse en el genoma. En este sentido, los marcadores se emplean como los mojones utilizados por los viajeros en los siglos anteriores. Viajeros que no estaban interesados en los propios mojones (marcadores) y, sin embargo, se habrían desorientado sin ellos.

Los dos tipos básicos de marcadores moleculares se fundamentan en las variaciones en las dianas de los enzimas de restricción y en la existencia de DNA repetido.

Utilización de los polimorfimos en la longitud de los fragmentos de restricción

Las enzimas de restricción bacterianas cortan el DNA en secuencias diana específicas que aparecen de manera aleatoria en el DNA de otros organismos. Normalmente, las dianas se encuentran en la misma posición del DNA de los distintos individuos de una población; esto es, en el DNA de los cromosomas homólogos. Sin embargo, con cierta frecuencia, una diana concreta puede desaparecer por causa de una mutación neutra. La mutación podría afectar a un gen o a una región intergénica. Si un indivi-

duo es heterocigótico para la presencia o ausencia (+/−) de la diana, podemos utilizar este locus en la cartografía genética. Los sitios +/− se determinan con la técnica Southern, utilizando una sonda que deriva del DNA de la región en la que se encuentra la diana. A continuación, se describe un ejemplo típico:

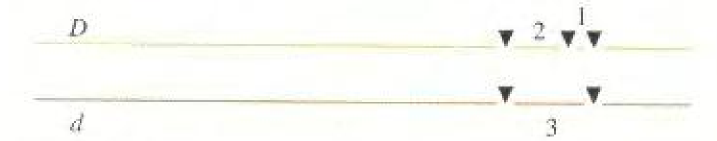


En la hibridación Southern del DNA de este individuo, la sonda revela tres fragmentos con un tamaño de 3, 2 y 1 kb. Otro individuo podría ser homocigótico para el fragmento de mayor tamaño y mostrar sólo la banda de 3 kb tras la hibridación Southern.



La existencia de múltiples formas para esta región es lo que se conoce como **polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP**; del inglés, *Restriction Fragment Lenght Polymorphism*).

En un cruzamiento entre los dos individuos anteriormente descritos, siguiendo la ley de segregación mendeliana como lo haríamos para cualquier gen, la mitad de la descendencia mostraría tres fragmentos de restricción y la otra mitad un único fragmento. Por tanto, un RFLP puede tratarse y situarse en el mapa al igual que cualquier otro sitio cromosómico. El siguiente ejemplo muestra la existencia de ligamiento entre el RFLP de nuestro ejemplo y un gen heterocigótico, con *D* en fase de acoplamiento con la forma de las bandas de 1 y 2 kb del RFLP.



Distribución de loci | Distancia (cM) | Mapa de ligamiento | Idiograma

Clave

Polimorfismos en la longitud de secuencias cortas; Otros polimorfismos de DNA — Marcadores de DNA

Genes

Genes incluidos en el mapa de ligamiento

Figura 5-16. Mapa de ligamiento del cromosoma 1 humano, correlacionado con su patrón de bandas. El histograma muestra la distribución de todos los marcadores disponibles del comosoma 1. Algunos marcadores son genes de fenotipo conocido, pero la mayoría son marcadores de DNA basados en variaciones neutras de las secuencias.

En la parte central de la figura, aparece un mapa de ligamiento basado en el análisis de las frecuencias de recombinación del tipo que se ha descrito en este capítulo. El mapa muestra sólo alguno de los marcadores disponibles. Las distancias de mapa vienen indicadas en centimorgans (= m.u.). La longitud total del mapa del cromosoma 1 es de 356 cM; se trata del más largo de los cromosomas humanos.

Las posiciones de algunos marcadores se han relacionado con el diagrama de las subregiones del cromosoma 1 basadas en el patrón estándar de bandas (dicho diagrama recibe la denominación de idiograma). Este tipo de correspondencia se puede establecer sólo mediante hibridación *in situ* (Cap. 14) o análisis citogenético (Cap. 17). La mayoría de los marcadores mostrados en el mapa son moleculares, pero se incluyen también varios genes (destacados en azul): APOA2, apolipoproteína; ACTN2, proteína actina; CRP, proteína reactiva C; SPAT1, proteína espectrina. (Tomado de B. R. Jasney et al., *Science*, 30 de septiembre, 1994.)

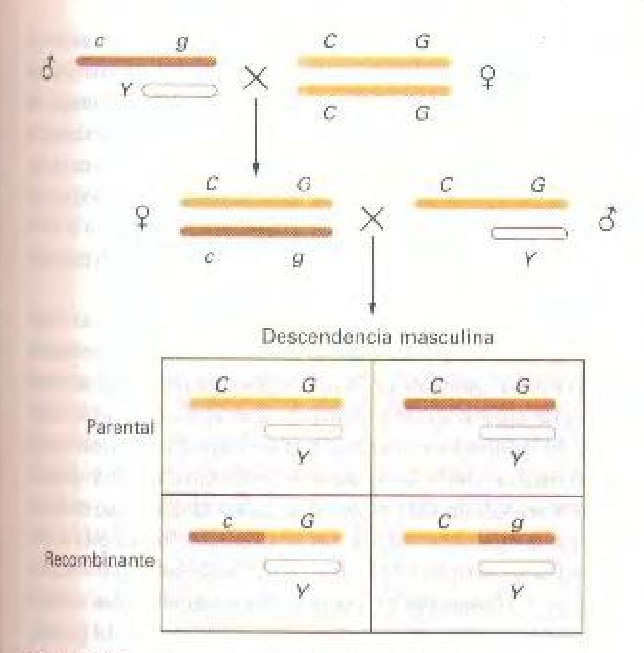
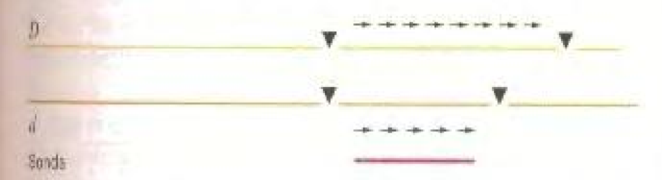


Figura 5-17. Las proporciones fenotípicas entre los hijos varones de una mujer heterocigótica para dos genes ligados al cromosoma X se pueden utilizar para calcular la frecuencia de recombinación. Así, se puede realizar la cartografía del cromosoma X combinando pedigríes de este tipo.

Los entrecruzamientos entre estos sitios darían lugar a productos recombinantes detectables como *D*–3 y *d*–2–1. De esta forma, el RFLP se puede situar en el mapa en relación a la posición de genes o de otros marcadores moleculares.

Utilización de los polimorfismos en VNTR en la cartografía genética

El número de unidades repetidas en las secuencias organizadas en tándem es variable. Sin entrar, de momento, en el mecanismo que genera esta variabilidad, lo fundamental para lo que nos concierne en este tema es que podemos detectar a los individuos heterocigóticos para el número de repeticiones en un determinado VNTR, y este sitio en heterocigosis se puede utilizar como marcador en cartografía genética. Para ello, se necesita una sonda que hibride con el DNA repetido. En el ejemplo que se muestra a continuación, se utilizan dianas para enzimas de restricción que están fuera de la unidad que se repite. La unidad básica repetida se indica con una flecha



Este locus de VNTR formará dos bandas, una grande y otra pequeña, una vez que se aplique la técnica Southern y se obtenga una autorradiografía. Una vez más, el sitio heterocigótico se puede utilizar en la cartografía tal y como sucedía con cualquier locus de RFLP.

Mapas de ligamiento por recombinación en la especie humana

Los seres humanos tienen miles de fenotipos que muestran herencia autosómica y, aparentemente, parece relativamente sencillo situar en el mapa genético los loci de los genes responsables de estos fenotipos, empleando las técnicas que se han desarrollado en este capítulo. Sin embargo, por varias razones, el progreso en la cartografía de estos loci fue lento en su inicio. En primer lugar, no resulta posible realizar cruzamientos controlados en los seres humanos, de forma que los genetistas debían intentar el cálculo de las frecuencias de recombinación a partir de los dihíbridos que, de vez en cuando, se producían de manera aleatoria en los apareamientos. Además, los cruzamientos equivalentes a los de prueba eran extraordinariamente raros. En segundo lugar, la descendencia de una pareja es normalmente escasa, lo que dificulta la obtención de los datos mínimos imprescindibles para calcular distancias de mapa fiables. En tercer lugar, el genoma humano es inmenso, lo que implica que la media de las distancias entre genes conocidos son grandes.

Los marcadores de DNA han sido de gran ayuda en la cartografía genética de los cromosomas humanos; y la Figura 5-16 muestra un ejemplo.



Figura 5-18. Mapa de ligamiento del cromosoma X humano, uno de los primeros mapas cromosómicos humanos. Se basa únicamente en el análisis de las RF entre los loci mostrados, sin la utilización de marcadores moleculares o técnicas de hibridación de células somáticas (Cap. 6). Se indican las posiciones de mapa provisionales para los loci. (Tomado de W. F. Bodmer y L. L. Cavalli-Sforza, *Genetics, Evolution, an Man*. Copyright © 1976 de W. H. Freeman and Company.)

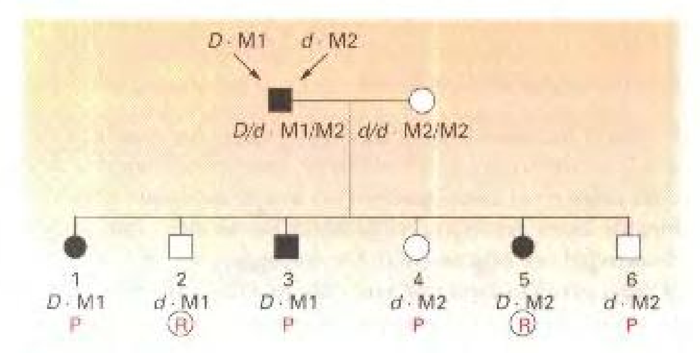


Figura 5-19. Pedigrí equivalente a un cruzamiento de prueba. *D/d* son alelos de un gen relacionado con una enfermedad; M1 y M2 son «alelos» moleculares, por ejemplo dos formas de un RFLP. P, parental (no recombinante); R (recombinante).

Cartografía genética del cromosoma X

El cromosoma X humano ha sido siempre más accesible que los autosomas a la cartografía genética mediante análisis de recombinación; y, de hecho, el primer mapa que se obtuvo de un cromosoma humano fue el del X. Esto se debe a que los varones son hemicigóticos para los genes ligados al X. Así, al igual que vimos para *Drosophila*, cuando observamos únicamente la descendencia masculina de una mujer dihíbrida estamos analizando la constitución genética de los gametos de dicha mujer. En otras palabras, tenemos una situación muy aproximada a la del cruzamiento de prueba. Considere la situación siguiente, en la que están implicados dos alelos recesivos raros ligados al cromosoma X, uno provoca incapacidad para metabolizar azúcar (*g*) y el otro, en un locus distinto, ceguera a los colores (*c*). Un varón afectado de ambas condiciones (*c g*/Y) se casa con una mujer normal (que es, casi con total certeza, *C G*/*C G*). Las hijas de esta pareja son heterocigóticas en fase de acoplamiento, y los hijos varones de estas mujeres ofrecerán a los genetistas la oportunidad de medir la frecuencia de recombinación en las meiosis de las madres (Fig. 5-17). La Figura 5-18 muestra un mapa de algunos genes del cromosoma X humano que son responsables de fenotipos ligados a dicho cromosoma. Tenga en cuenta que los marcadores moleculares también se pueden utilizar en la cartografía genética del cromosoma X.

Puntuación Lod en el análisis de ligamiento en pedigríes

El escaso número de descendientes en las familias humanas lleva implícito la imposibilidad de determinar la existencia de ligamiento en base a un único apareamiento. Para obtener valores fiables de RF, se necesitan tamaños de muestra grandes. No obstante, si se combinan los resultados de muchos apareamientos idénticos, se puede obtener una estima más fiable. La forma usual de hacer esto es mediante el cálculo de las **puntuaciones Lod**. El término Lod es un acrónimo de la expresión inglesa *Log Of Odds* (logaritmo de las probabilidades). El método calcula simplemente la probabilidad de obtener un conjunto de resultados en una familia basándose en la existencia de segregación independiente, por un lado, y en la de un grado concreto de ligamiento, por otro. A continuación se calcula el cociente de las dos probabilidades, siendo la puntuación Lod el logaritmo de este valor. Puesto que los logaritmos tienen una base exponencial, la puntuación Lod tiene la útil característica de que se pueden sumar las puntuaciones de varios cruzamientos en los que se hayan utilizado los mismos marcadores; y, por lo tanto, suministran un conjunto acumulativo de datos que apoyarán o no un determinado valor de ligamiento. Veamos un ejemplo sencillo sobre cómo se hace el cálculo.

Supongamos que tenemos un familia equivalente al cruzamiento de prueba de un dihíbrido, y que podemos deducir el genotipo de los gametos producidos por este individuo, de forma que resulta posible determinar si los gametos son o no recombinantes. El dihíbrido es heterocigótico para un alelo dominante que determina cierta enfermedad hereditaria (*D*/*d*) y para un marcador molecular (M1/M2). Asumamos también que es un varón y que los gametos que se fusionaron para formar este individuo eran de genotipo *D* · M1 y *d* · M2. Su mujer es *d*/*d* · M2/M2. La Figura 5-19 muestra un pedigrí en el que se pueden observar los seis hijos de la pareja, caracterizados en función del genotipo de los gametos provenientes del padre. De los seis, dos son recombinantes, lo que daría una RF del 33 %. Sin embargo, es posible que los dos marcadores segreguen independientemente y que los hijos representen una desviación aleatoria del resultado esperado para esta condición. Calculemos la probabilidad de este resultado considerando varias hipótesis. A continuación, se indican las proporciones esperadas de los genotipos parentales (P) y recombinantes (R) con tres valores de RF y con segregación independiente.

RF	0.5	0.4	0.3	0.2
P	0.25	0.3	0.35	0.4
P	0.25	0.3	0.35	0.4
R	0.25	0.2	0.15	0.1
R	0.25	0.2	0.15	0.1

La probabilidad de obtener los resultados habiendo segregación independiente (RF del 50 %) será igual a:

$$0.25 \times 0.25 \times 0.25 \times 0.25 \times 0.25 \times 0.25 \times \mathrm{B} = 0.00024 \times \mathrm{B}$$

donde B = número total de posibles combinaciones para el nacimiento de cuatro individuos parentales y dos recombinantes.

Para una RF de 0.2 la probabilidad es:

$$0.4 \times 0.1 \times 0.4 \times 0.4 \times 0.1 \times 0.4 \times \mathrm{B} = 0.00026 \times \mathrm{B}$$

Por tanto, el cociente de los dos es 0.00026/0.00024 = 1.08 (observe que B se elimina). Así, en función de estos datos, la hipótesis de una RF de 0.2 es 1.08 veces más probable que la de la segregación independiente. A continuación, se muestran otros cocientes y sus valores Lod:

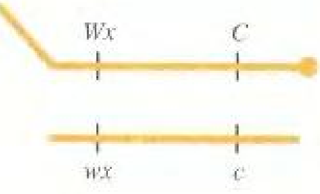
RF	0.5	0.4	0.3	0.2
Probabilidad	0.00024	0.00032	0.00034	0.00026
Cociente	1.0	1.33	1.41	1.08
Lod	0	0.12	0.15	0.03

Estos números confirman nuestras sospechas iniciales de que la RF está entre 30 y 40 %. Sin embargo, los datos no proporcionan un apoyo convincente de la existencia de ligamiento. Por con-

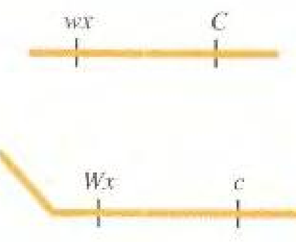
vención, se considera que las puntuaciones Lod de 3 determinan un apoyo convincente de ligamiento con un valor de RF concreto. Observe que una puntuación Lod de 3 representa un valor de RF que es 1000 veces (esto es, 10^3 veces) más probable que la hipótesis de ausencia de ligamiento.

Naturaleza del entrecruzamiento

La idea de que los recombinantes intracromosómicos se originaban por algún tipo de intercambio de material entre cromosomas homólogos era convincente. No obstante, esta idea debía ser comprobada con algún experimento. Uno de los primeros pasos consistió en correlacionar la aparición de recombinantes genéticos con intercambios entre partes de cromosomas. Varios investigadores siguieron la misma estrategia para abordar este problema. En 1931, Harriet Creighton y Barbara McClintock estaban estudiando dos loci del cromosoma 9 del maíz: uno afectaba al color de la semilla (*C*, coloreado; *c*, no coloreado) y el otro afectaba a la composición del endospermo (*Wx*, ceroso; *wx*, feculento). Además, el cromosoma que llevaba *C* y *Wx* era inusual, ya que contenía una protuberancia grande y teñida intensamente en el extremo cercano a *C* y una región cromosómica más larga en el extremo donde se encontraba *Wx*: así, el heterocigoto era



Cuando compararon los cromosomas de los recombinantes genéticos con los de la descendencia de tipo parental, Creighton y McClintock encontraron que toda la progenie de tipo parental mantuvo la organización de los cromosomas parentales, mientras que todos los recombinantes fueron



De esta manera, relacionaron el fenómeno genético de la recombinación intracromosómica con el citológico. Los quiasmas parecían representar los sitios del intercambio, pero la prueba final de esto no llegó hasta 1978.

¿Cuál es el mecanismo de intercambio cromosómico en el entrecruzamiento? Concisamente, la respuesta es que el entrecruzamiento resulta de un proceso de rotura y unión de los cromosomas. Dos cromosomas parentales se rompen en la misma posición y vuelven a unirse de nuevo en dos combinaciones no parentales. En el Capítulo 19 estudiaremos modelos de los procesos moleculares que permiten al DNA romperse y unirse de forma tan precisa.

COROLARIO

Los cromosomas se entrecruzan rompiéndose en la misma posición y uniéndose en las dos combinaciones no parentales recíprocas.

Observará que, en nuestra representación esquemática del entrecruzamiento en este capítulo, hemos mostrado que éstos ocurren en la fase de cuatro cromátidas de la meiosis. Sin embargo, no es posible distinguir esta posibilidad del entrecruzamiento en la fase de dos cromosomas tan sólo mediante el estudio de los productos aleatorios de recombinación de la meiosis, como en un cruzamiento de prueba. Este asunto quedó resuelto a través del análisis genético de organismos cuyos productos meióticos permanecen juntos en grupos de cuatro llamados **tétradas**. Estos organismos son fundamentalmente los hongos y las algas unicelulares. En ellos, se pueden aislar los cuatro productos meióticos en una sola tétrada, lo que es equivalente a aislar las cuatro cromátidas resultantes de una única meiosis. El análisis de tétradas en los cruzamientos con genes ligados muestra con claridad que, en muchos casos, las tétradas contienen los cuatro genotipos diferentes relacionados con estos loci; por ejemplo, en el cruzamiento

$$A\ B \times a\ b$$

Algunas tétradas presentan los cuatro genotipos

$$\begin{array}{c} A\ B \\ A\ b \\ a\ B \\ a\ b \end{array}$$

Este resultado puede explicarse únicamente porque haya tenido lugar un entrecruzamiento en la fase de cuatro cromátidas, ya que, si el entrecruzamiento hubiera ocurrido en la fase de dos cromosomas, tan sólo debería haber dos genotipos diferentes en una meiosis individual, como se muestra en la Figura 5-20.

El análisis de tétradas facilita la exploración de muchos otros aspectos de la recombinación intracromosómica, que se tratarán

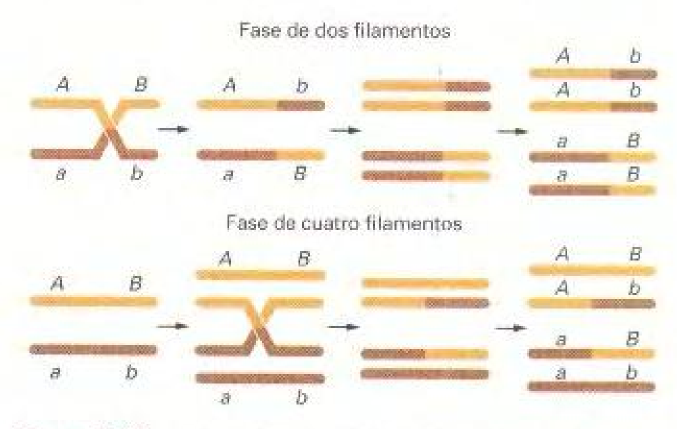


Figura 5-20. El análisis de tétradas proporciona evidencias que permiten a los genetistas decidir si el entrecruzamiento sucede en la fase de dos filamentos (dos cromosomas) o en el de cuatro filamentos (cuatro cromátidas). Puesto que en algunas tétradas se pueden observar más de dos productos distintos procedentes de una sola meiosis, el entrecruzamiento no puede suceder nunca en la fase de dos filamentos.

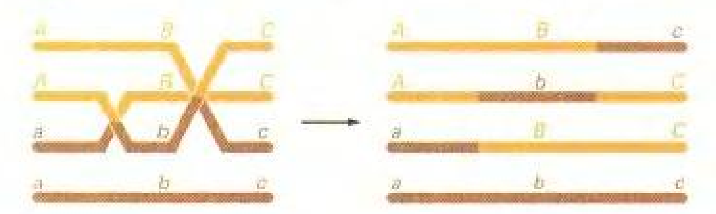


Figura 5-21. Uno de los varios tipos posibles de tétradas dobles recombinantes que se observan con regularidad. Observe que están implicadas más de dos cromátidas intercambiando segmentos.

en detalle en el Capítulo 6. No obstante, de momento, utilizaremos las tétradas para responder dos cuestiones fundamentales sobre el entrecruzamiento. La primera, ¿puede haber múltiples entrecruzamientos entre más de dos cromátidas? Para responder a esto, tenemos que observar los entrecruzamientos dobles; y, para estudiarlos, necesitamos tres genes ligados. Por ejemplo, en el cruzamiento

$$A\ B\ C \times a\ b\ c$$

pueden darse muchas tétradas distintas, pero algunas de ellas únicamente se pueden explicar con entrecruzamientos dobles. Considere la tétrada siguiente como un ejemplo:

A B c
A b C
a B C
a b c

Esta tétrada se puede explicar por dos hechos de entrecruzamiento que implican a dos cromátidas, como se muestra en la Figura 5-21. Otros tipos de tétradas indican que el total de las cuatro cromátidas pueden participar en entrecruzamientos en la misma meiosis. Por lo tanto, las cromátidas que toman parte en el fenómeno de entrecruzamiento en una sola meiosis pueden ser dos, tres o cuatro.

Si todas las cromátidas participan en el proceso, podemos preguntarnos si hay algún tipo de **interferencia de cromátidas.** En otras palabras, ¿el que se produzca un entrecruzamiento entre dos cromátidas no hermanas afecta a la probabilidad de que esas dos cromátidas intervengan en otro entrecruzamiento de la misma meiosis? El análisis de tétradas puede responder a esta pregunta y demuestra que la distribución de entrecruzamientos entre las cromátidas ocurre normalmente al azar; es decir, no hay interferencia de cromátidas.

Antes de finalizar nuestro análisis sobre la implicación de las cromátidas en los entrecruzamientos, merece la pena que nos planteemos otra pregunta: ¿Puede haber entrecruzamiento entre cromátidas hermanas? En algunos organismos, se ha demostrado que sí se produce entrecruzamiento entre cromátidas hermanas; sin embargo, puesto que esto no da lugar a recombinantes y, además, no está claro que ocurra en todos los organismos, lo normal es no indicar este tipo de intercambio en los esquemas que representan entrecruzamientos.

El entrecruzamiento es un fenómeno extraordinariamente preciso. La sinapsis y el intercambio cromosómico ocurren de tal manera que no se pierde ni se gana ningún segmento, y aparecen cuatro cromosomas completos en la tétrada. Se ha aprendido mucho sobre la naturaleza de los procesos moleculares que tienen lugar en los sitios de entrecruzamiento y en sus proximidades, y los trataremos en el Capítulo 19.

RESUMEN

William Bateson y R. C. Punnett descubrieron desviaciones de la proporción fenotípica esperada, 9:3:3:1, en la generación F_2 de cruzamientos dihíbridos con cierta variedad de guisante. Los tipos gaméticos parentales aparecían en un número mucho mayor que las otras dos clases. Con posterioridad, Thomas Hunt Morgan encontró una desviación similar de la ley de la segregación independiente de Mendel, en su estudio sobre dos genes autosómicos distintos de *Drosophila*. Morgan propuso que los dos genes estaban situados en el mismo par de cromosomas homólogos. Este fenómeno recibe la denominación de ligamiento.

El ligamiento explica la razón por la que las combinaciones parentales de alelos permanecen juntas, pero no explica cómo aparecen las combinaciones no parentales. Morgan propuso que, durante la meiosis, puede haber un intercambio físico de fragmentos cromosómicos, mediante un proceso que en la actualidad se denomina entrecruzamiento. Por tanto, existen dos tipos de recombinación meiótica. La recombinación debida a la segregación independiente mendeliana tiene como resultado una frecuencia de recombinantes del 50%. El entrecruzamiento da lugar a una frecuencia de recombinantes menor del 50%.

Conforme estudió más genes ligados, Morgan descubrió mucha variación en las frecuencias de recombinantes y se preguntó si esta variación reflejaba la distancia real entre los genes de un cromosoma. Alfred Sturtevant, un estudiante de Morgan, desarrolló un método basado en el porcentaje de recombinantes para determinar la distancia entre genes en un mapa de ligamiento. Un mapa de ligamiento es otro ejemplo de un ente hipotético que surge del análisis genético.

La forma más sencilla de determinar las frecuencias de recombinación es mediante el cruzamiento de prueba de un dihíbrido o de un trihíbrido. No obstante, las frecuencias de recombinación se pueden deducir también a partir de cruzamientos dihíbridos.

Aunque la prueba básica de ligamiento es la desviación de la proporción 1:1:1:1 entre la descendencia de un cruzamiento de prueba, tal desviación puede no ser tan obvia. La prueba del χ^2 que nos dice con qué frecuencia los valores observados se desvían de los esperados simplemente por azar, puede ayudarnos a decidir si hay ligamiento o no.

Se han apuntado varias teorías para explicar cómo se generan los cromosomas recombinantes. Hoy, sabemos que el entrecruzamiento resulta de la rotura y unión físicas de fragmentos cromosómicos y tiene lugar durante la fase de cuatro cromátidas de la meiosis.

Las variaciones neutras en el DNA se utilizan en la actualidad como fuente de marcadores para la cartografía cromosómica.

En el análisis de pedigríes, el tamaño de la muestra es demasiado pequeño como para permitir la cartografía genética. No obstante, la acumulación de datos, expresada como puntuaciones Lod, puede demostrar la existencia de ligamiento.

Mapa de conceptos

Trace un mapa de conceptos, relacionando entre sí tantos de los siguientes términos como le sea posible. Observe que los conceptos no están en ningún orden concreto.

entrecruzamiento / cromátidas / cartografía / cromosomas / cruzamiento de prueba / ligamiento / unidades de mapa / recombinación / aditividad / segregación independiente

Problema de integración de capítulos

En *Drosophila*, los alelos *P* y *p* determinan ojos de color rojo y púrpura, respectivamente. Los alelos *B* y *b* determinan cuerpo de color marrón y negro, respectivamente. Un genetista cruza una hembra de una línea pura de ojos púrpuras y cuerpo marrón con un macho, también de una línea pura, de ojos rojos y cuerpo negro. Todas las moscas de la F_1 tienen ojos rojos y cuerpo marrón. Cruzando entre sí las moscas de la F_1, el genetista obtiene la F_2. Ésta la componen los individuos siguientes:

marrones, rojos	684
marrones, púrpuras	343
negros, rojos	341
	1368

¿Qué nos dicen estos datos sobre la localización cromosómica de los genes?

♦ Solución ♦

Al reflexionar sobre la localización cromosómica, ¿cuáles de los fenómenos que hemos estudiado hasta ahora vienen a nuestra mente? En primer lugar, está la distinción entre herencia autosómica y ligada al sexo. Luego están las posibilidades alternativas de ligamiento o segregación independiente. No tenemos mucho más que nos preocupe en este momento. ¿Cómo podemos despejar estas incógnitas? Empecemos con el ligamiento al sexo. La característica distintiva del ligamiento al sexo es la aparición de un patrón de herencia que se relaciona de alguna manera con el sexo. No existen pruebas de ello en nuestros datos. Así que, dado que no recibimos información en otro sentido, debemos suponer que se obtuvo el mismo número de machos y hembras de cada clase. Sin embargo, hay un hecho relacionado con el sexo que debemos tener en cuenta siempre que tratemos con la genética de *Drosophila;* como hemos visto en este capítulo, no se producen entrecruzamientos en las meiosis de los machos de *Drosophila.* De momento, mantendremos este dato en la recámara; ya que podría sernos útil más tarde.

Así que hemos llegado a la conclusión de que ambos genes son autosómicos. Ahora podemos reconstruir los cruzamientos empleando símbolos genéticos, para volver a plantear lo que ya sabemos, pero en un formato ligeramente distinto.

$$
\begin{array}{ll}
\text{P} & B/B \cdot p/p \times b/b \cdot P/P \\
 & \downarrow \\
\text{F}_1 & B/b \cdot P/p \\
 & B/b \cdot P/p \times B/b \cdot P/p \\
 & \downarrow \\
\text{F}_2 & B/- \cdot P/- \\
 & B/- \cdot p/p \\
 & b/b \cdot P/-
\end{array}
$$

Ahora vemos con más claridad qué tienen de inusual estos datos. El cruzamiento entre las moscas de la F_1 es un cruzamiento dihíbrido y, de acuerdo con la segunda ley de Mendel, esperamos que dos genes que segregan independientemente den cuatro clases fenotípicas en la F_2 con proporción 9:3:3:1. Aquí tenemos sólo tres clases fenotípicas, y en proporción 2:1:1. Ciertamente, algo más está ocurriendo. La clase que falta es la de genotipo $b/b \cdot p/p$, así que una cosa clara es que ocurre algo que impide la aparición de esa clase.

Recordando la exposición sobre letalidad del Capítulo 4, podríamos especular con la idea de que el genotipo $b/b \cdot p/p$ es letal. Sin embargo, eso es poco probable, porque nos dejaría con la fracción 9:3:3 de la proporción esperada, que puede reducirse a una proporción 3:1:1, no 2:1:1. No obstante, acabamos de considerar en este capítulo otro fenómeno que impide que los genes segreguen libremente a la hora de producir los genotipos, esto es, el ligamiento. Así que exploremos esta posibilidad. Según esta hipótesis, describiríamos el cruzamiento como sigue:

$$
\begin{array}{ll}
\text{P} & \dfrac{B\ p}{B\ p} \times \dfrac{b\ P}{b\ P} \\
 & \downarrow \\
\text{F}_1 & \dfrac{B\ p}{b\ P}
\end{array}
$$

Si esto es correcto, ¿qué proporciones esperamos en la F_2? Podríamos pensar que, para responder a esta pregunta, deberíamos conocer el número de unidades de mapa que separa ambos loci. Ello es razonable, pero hay que empezar por algún sitio, así que supongamos que los loci están separados por 20 unidades de mapa y veamos qué pasa. (Recuerde el análisis mediante prueba y error; los científicos lo usan mucho en sus cálculos.) Teniendo en cuenta que no hay entrecruzamientos en los machos, las predicciones para la F_2 podrían establecerse de la manera siguiente:

ÓVULOS		ESPERMA			
		B p	50 %	*b P*	50 %
B P	10 %	*B P*/*B p*	5 %	*B P*/*b P*	5 %
b p	10 %	*b p*/*B p*	5 %	*b p*/*b P*	5 %
B p	40 %	*B p*/*B p*	20 %	*B p*/*b P*	20 %
b P	40 %	*b P*/*B p*	20 %	*b P*/*b P*	20 %

En total, las proporciones fenotípicas son:

B P	5 + 5 + 20 + 20	= 50 %
B p	5 + 20	= 25 %
b P	5 + 20	= 25 %
b p		= 0 %

Esto nos da precisamente la proporción 2:1:1 que necesitábamos. ¿Cómo ha ocurrido? ¿Fuimos afortunados al escoger una frecuencia de recombinación del 20 %? La respuesta es no. No importa qué frecuencia hubiéramos escogido, se habría mantenido el mismo resultado (compruébelo).

Por tanto, como conclusión, podemos decir que la proporción fenotípica obtenida se debe a la herencia de genes ligados que estaban en fase de repulsión en los parentales, pero no podemos determinar a qué distancia se encuentran. Una cartografía más precisa requeriría un cruzamiento de prueba.

Aunque éste haya sido un problema con un pequeño truco, el camino seguido para resolverlo demuestra la variedad de conceptos distintos que pueden emplearse para descartar ciertas posibilidades y llegar a una solución que funcione.

PROBLEMAS RESUELTOS

1. En *Drosophila*, el alelo *b* produce cuerpo negro y el b^+ cuerpo marrón, el fenotipo silvestre. El alelo *wx*, de un gen distinto, produce alas cerosas y el wx^+ alas no cerosas, el fenotipo silvestre. El alelo *cn* de un tercer gen produce ojos cinabrios y el cn^+ ojos rojos, el fenotipo silvestre. Una hembra heterocigótica para estos tres genes se usa en un cruzamiento de prueba y se clasifican 1000 descendientes de la siguiente manera: 5 silvestres; 6 negros, cerosas y cinabrios; 69 cerosas, cinabrios; 67 negros; 382 cinabrios; 379 negros, cerosas; 48 cerosas; y 44 negros, cinabrios.

   a. Explique estos números.

   b. Dibuje los alelos en sus posiciones correctas sobre los cromosomas de la hembra triple heterocigótica.

   c. Si fuera posible, de acuerdo con su explicación, calcule la interferencia.

   d. Si cruzamos dos heterocigotos triples como el anterior, ¿qué proporción de la descendencia sería de cuerpo negro y alas cerosas? (Recuerde que en los machos de *Drosophila* no hay entrecruzamientos.)

♦ Solución ♦

a. Un consejo de carácter general que hemos dado con anterioridad es el de ser metódicos. Aquí, una buena sugerencia es escribir los genotipos que puedan inferirse de los fenotipos. El experimento es un cruzamiento de prueba del siguiente tipo:

$$b^+/b \cdot wx^+/wx \cdot cn^+/cn \times b/b \cdot wx/wx \cdot cn/cn$$

Observe que hay distintas parejas de clases, según su frecuencia, entre los descendientes. Ya podemos adivinar que las dos clases más frecuentes representan cromosomas parentales, las dos clases de unos 68 individuos representan entrecruzamientos únicos en una región, las dos clases de unos 45 individuos representan entrecruzamientos únicos en la otra región y las dos clases de unos 5 individuos representan dobles entrecruzamientos. Podemos describir los descendientes como clases derivadas de los gametos de la hembra, y agruparlos como sigue:

$b^+ \cdot wx^+ \cdot cn$	382
$b \cdot wx \cdot cn^+$	379
$b^+ \cdot wx \cdot cn$	69
$b \cdot wx^+ \cdot cn^+$	67
$b^+ \cdot wx \cdot cn^+$	48
$b \cdot wx^+ \cdot cn$	44
$b \cdot wx \cdot cn$	6
$b^+ \cdot wx^+ \cdot cn^+$	5
	1000

Escribiendo así las distintas clases, confirmamos que las parejas de clases son, en realidad, genotipos recíprocos que resultan de cero, uno o dos entrecruzamientos.

A primera vista, parece que no pudiéramos aplicar la definición de recombinación, en la que los genotipos gaméticos se comparan con los dos genotipos de entrada que participaron en la constitución de un individuo, puesto que no conocemos los parentales de la hembra triple heterocigótica. Pero, reflexionando un poco, los únicos genotipos parentales que tienen sentido, según los datos disponibles, son $b^+/b^+ \cdot wx^+/wx^+ \cdot cn/cn$ y $b/b \cdot wx/wx \cdot cn^+/cn^+$, pues constituyen las clases más frecuentes.

Ahora podemos calcular las frecuencias de recombinación. Para

$$b - wx, \text{ la RF} = \frac{69 + 67 + 48 + 44}{1000} = 22.8\,\%$$

$$b - cn, \text{ la RF} = \frac{48 + 44 + 6 + 5}{1000} = 10.3\,\%$$

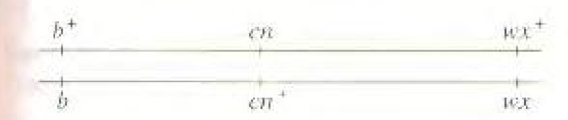
$$wx - cn, \text{ la RF} = \frac{69 + 67 + 6 + 5}{1000} = 14.7\,\%$$

Por tanto, el mapa es

b —— *cn* —— *wx*

←— 10.3 m.u. —→←— 14.7 m.u. —→

b. Los cromosomas parentales de la hembra triple heterocigótica eran



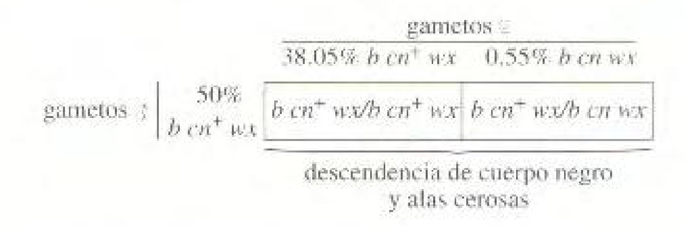
c. El número de recombinantes dobles esperados es $0.103 \times 0.147 \times 1000 = 15.141$. El número observado es $6 + 5 = 11$, de manera que la interferencia podemos calcularla como $I = 1 - 11/15.141 = 1 - 0.726 = 0.274 = 27.4\%$.

d. En este apartado se nos pide que utilicemos los conocimientos adquiridos sobre el ligamiento de estos genes para predecir el resultado de un cruzamiento. Dése cuenta que no se trata de un cruzamiento de prueba. Nos preguntan por la proporción esperada de moscas de cuerpo negro y alas cerosas entre la descendencia de dos heterocigotos triples. Puesto que el macho no sufre entrecruzamientos, la mitad de sus gametos serán $b\ cn^+\ wx$ y la otra mitad $b^+\ cn\ wx^+$, aunque estos últimos no contribuyen al fenotipo de cuerpo negro y alas cerosas. En la hembra, dos tipos gaméticos distintos pueden contribuir a que la descendencia sea de cuerpo negro y alas cerosas: $b\ cn^+\ wx$ y $b\ cn\ wx$. En suma, las posibles contribuciones de los parentales a este fenotipo son las siguientes:

		gametos ♀	
		$b\ cn^+\ wx$	$b\ cn\ wx$
gametos ♂	$b\ cn^+\ wx$	$b\ cn^+\ wx/b\ cn^+\ wx$	$b\ cn^+\ wx/b\ cn\ wx$

El cromosoma de la hembra que lleva $b\ cn^+\ wx$ es un tipo parental no recombinante. Hay un total de $(382 + 379)/1000 = 76.1\ \%$ de cromosomas parentales no recombinantes, la mitad de los cuales, es decir, el 38.05 %, llevan $b\ cn^+\ wx$. La frecuencia de $b\ cn\ wx$ es $(11/2)/1000 = 0.55\ \%$. Por tanto, en total, $38.05 + 0.55 = 38.6\ \%$ de los gametos femeninos pueden dar lugar a descendencia de cuerpo negro y alas cerosas; la mitad de ellos serán fecundados por gametos $b\ cn^+\ wx$ del macho, así que la frecuencia esperada de descendientes de cuerpo negro y alas cerosas es $38.6/2 = 19.3\ \%$.

En resumen, las fusiones gaméticas apropiadas pueden describirse de esta manera:



		gametos ♀	
		38.05% $b\ cn^+\ wx$	0.55% $b\ cn\ wx$
gametos ♂	50% $b\ cn^+\ wx$	$b\ cn^+\ wx/b\ cn^+\ wx$	$b\ cn^+\ wx/b\ cn\ wx$

descendencia de cuerpo negro y alas cerosas

2. El pedigrí humano de esta página muestra un caso de herencia del raro síndrome uña-rótula (uñas y rótulas deformadas). Muestra también el genotipo de cada individuo para el grupo sanguíneo ABO. Ambos loci implicados son autosómicos.

a. Indique si el síndrome uña-rótula es dominante o recesivo. Ofrezca las razones que apoyan su respuesta.

b. A juzgar por este pedigrí, ¿existen pruebas de ligamiento entre el gen uña-rótula y el gen para el grupo sanguíneo ABO? ¿Por qué sí o por qué no?

c. Si existen pruebas de ligamiento, dibuje los alelos sobre los cromosomas homólogos implicados de los abuelos. Si no hay pruebas de ligamiento, dibuje la configuración de las dos parejas de homólogos.

d. Según su modelo, ¿qué descendientes corresponden a recombinantes?

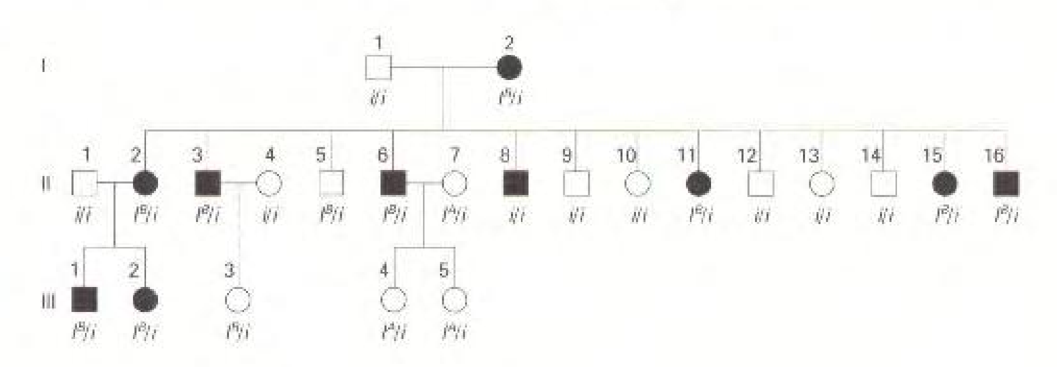
e. ¿Cuál es la mejor estimación de la RF?

f. Si el varón III-1 se casa con una mujer normal de grupo sanguíneo O, ¿cuál es la probabilidad de que su primer hijo sea de tipo B y tenga el síndrome uña-rótula?

♦ Solución ♦

a. Lo más probable es que el síndrome uña-rótula sea dominante. Se nos dice que es una anomalía rara, de manera que es muy improbable que las personas no afectadas que se introducen en la familia, por casamiento, lleven un supuesto alelo recesivo para el síndrome. Llamemos N al alelo causante del síndrome. Todas las personas afectadas son heterocigóticas N/n, ya que todas ellas (incluyendo también, probablemente, a la abuela) proceden de un matrimonio con un individuo normal n/n. Observe que el síndrome aparece en tres generaciones sucesivas, otra indicación de herencia dominante.

b. Hay pruebas de la existencia de ligamiento. Observe que la mayoría de los símbolos negros —aquellos que llevan el alelo N— también llevan el alelo I^B; muy probablemente, ambos alelos están ligados al mismo cromosoma.



c. Los abuelos deben ser:

$$\frac{n \quad i}{n \quad i} \times \frac{N \quad I^B}{n \quad i}$$

(La abuela debe llevar ambos alelos recesivos para producir descendientes de genotipo *i/i* y *n/n*).

d. Observe que el casamiento entre los abuelos equivale a un cruzamiento de prueba, así que los recombinantes de la generación II son:

II-5: $n\,I^B/n\,i$ y II-8: $N\,i/n\,i$

mientras que el resto no son recombinantes, siendo bien $N\,I^B/n\,i$ o $n\,i/n\,i$.

e. Observe que el matrimonio de los abuelos y los dos primeros matrimonios de la generación II son idénticos y equivalentes a cruzamientos de prueba. Hay un total de 16 descendientes; tres de ellos (II-5, II-8 y III-3) son recombinantes. Esto nos da una frecuencia de recombinación de $RF = \frac{3}{16} = 18.8\,\%$.

(No incluimos el matrimonio II-6 × II-7, porque no podemos distinguir entre sus descendientes a los que son o no recombinantes.)

f. (III-1 ♂) $\frac{N \quad I^B}{n \quad i} \times \frac{n \quad i}{n \quad i}$ (normal grupo O ♀)

↓

Gametos

81.2 % { $N\,I^B$ 40.6 % ⟵ uña-rótula, sangre de grupo B; $n\,i$ 40.6 % }

18.8 % { $N\,i$ 9.4 %; $n\,I^B$ 9.4 % }

Las dos clases parentales aparecen con igual porcentaje, y lo mismo ocurre con las dos recombinantes. Por tanto, la probabilidad de que el primer hijo tenga el síndrome uña-rótula y sea de grupo B es del 40.6 %.

PROBLEMAS

1. Una planta de genotipo.

$$\frac{A \quad B}{a \quad b}$$

se utiliza en un cruzamiento de prueba con una planta

$$\frac{a \quad b}{a \quad b}$$

Teniendo en cuenta que los dos loci están a 10 m.u. de distancia, ¿qué proporción de la descendencia será *A B/a b*?

2. Los loci *A* y *D* están ligados tan estrechamente que no se ha observado nunca recombinación entre ellos. Si se cruza *A d/A d* por *a D/a D*, y los individuos de la F_1 se cruzan entre sí, ¿qué fenotipos se observarán en la F_2 y en qué proporciones?

3. Los loci *R* y *S* se encuentran a 35 m.u. de distancia. Si se autopoliniza una planta de genotipo

$$\frac{R \quad S}{r \quad s}$$

¿qué fenotipos se observarán en la descendencia y en qué proporciones?

4. Se realiza el cruzamiento *E/E · F/F* × *e/e · f/f* y la F_1 se usa en un cruzamiento de prueba con el parental recesivo. Los genotipos de los descendientes se infieren de sus fenotipos. Dichos genotipos, descritos según la contribución gamética del progenitor heterocigótico, aparecen en las siguientes porporciones:

E · F	$\frac{2}{6}$
E · f	$\frac{1}{6}$
e · F	$\frac{1}{6}$
e · f	$\frac{2}{6}$

Ofrezca una explicación a estos resultados.

5. Se cruza una estirpe de *Neurospora* de genotipo *H · I* con otra de genotipo *h · i*. La mitad de los descendientes son *H · I* y la otra mitad *h · i*. Explique cómo es posible este hecho.

6. Se cruza un animal hembra de genotipo *A/a · B/b* con un macho doble recesivo *(a/a · b/b)*. Los descendientes incluyen 442 *A/a · B/b*, 458 *a/a · b/b*, 46 *A/a · b/b* y 54 *a/a · B/b*. Dé una explicación a estos resultados.

7. Si se cruzan *A/A · B/B* y *a/a · b/b*, y la F_1 se somete a un cruzamiento de prueba, ¿qué porcentaje de los descendientes serán *a/a · b/b*, si los dos genes están (a) no ligados; (b) completamente ligados (no se produce ningún entrecruzamiento); (c) separados por 10 unidades de mapa; (d) separados por 24 unidades de mapa?

8. En un organismo haploide, los loci *C* y *D* se encuentran a una distancia de 8 m.u. En un cruzamiento *C d* × *c D*, indique la proporción en la descendencia de cada una de las clases siguientes: (a) *C D*, (b) *c d*, (c) *C d*, (d) todos los recombinantes.

9. Una mosca de genotipo *B R/b r* se utiliza en un cruzamiento de prueba con una mosca *b r/b r*. En el 84 % de las meiosis no se producen quiasmas entre los dos genes ligados; en el 16 % de las meiosis se produce un quiasma entre los genes. ¿Qué proporción de los descendientes será *B r/b r*?

10. Se ha realizado un cruzamiento de tres puntos con maíz. El resultado y un análisis de recombinación parcial, típico de un cruzamiento de prueba de tres puntos, se muestran a continuación (*p* = hojas púrpuras, + = hojas verdes; *v* = plántulas resistentes a virus, + = plántulas sensibles; *b* = semillas de borde marrón, + = semillas de color liso). Analice el conjunto de los resultados y responda a los apartados a, b y c.

P	+/+ · +/+ · +/+ × *p/p · v/v · b/b*
Gametos	+ · + · + *p · v · b*
F_1	+/*p* · +/*v* · +/*b* × *p/p · v/v · b/b* (prueba)

Clase	Fenotipos descendientes	Gametos F_1	Números	Recombinantes entre p-b	p-v	v-b
1	ver sen lis	$+ \cdot + \cdot +$	3210			
2	pur res bor	$p \cdot v \cdot b$	3222			
3	ver res lis	$+ \cdot v \cdot +$	1024		R	R
4	pur sen bor	$p \cdot + \cdot b$	1044		R	R
5	pur res lis	$p \cdot v \cdot +$	690	R		R
6	ver sen bor	$+ \cdot + \cdot b$	678	R		R
7	ver res bor	$+ \cdot v \cdot b$	72	R	R	
8	pur sen lis	$p \cdot + \cdot +$	60	R	R	
		Total	10 000	1500	2200	3436

a. Determine qué genes están ligados.

b. Dibuje un mapa que muestre las distancias en unidades de mapa.

c. En caso de que sea apropiado, calcule la interferencia.

El problema paso a paso

1. Haga dibujos de las plantas de maíz parentales (P), F_1 y de la utilizada como individuo de prueba, y utilice flechas para mostrar exactamente cómo realizaría este experimento. Indique de dónde se recogen las semillas.

2. ¿Por qué se emplea repetidas veces el símbolo +, incluso para genes distintos? ¿Por qué no lleva a confusión?

3. ¿Cómo puede un fenotipo ser púrpura y marrón (por ejemplo) al mismo tiempo?

4. ¿Es significativo que los genes se describan en el problema en el orden *p-v-b*?

5. ¿Qué es un individuo de prueba y por qué se utiliza en este tipo de análisis?

6. ¿Qué representa la columna marcada como «fenotipos descendientes»? En la clase 1, por ejemplo, ¿qué significa «ver sen lis»?

7. ¿Qué representa la línea marcada «Gametos» y en qué se diferencia de la columna marcada «Gametos F_1»? ¿Por qué es importante en el análisis de la recombinación la comparación entre esos dos tipos de gametos?

8. ¿Qué meiosis es la que importa en este estudio? Señálela en su dibujo.

9. ¿Por qué no se muestran los gametos del individuo de prueba?

10. ¿Por qué hay sólo 8 clases fenotípicas? ¿Falta alguna?

11. ¿Qué clases (y en qué proporciones) se esperarían si cada gen estuviera en un cromosoma distinto?

12. ¿A qué corresponden los cuatro tamaños de las clases (dos muy numerosas, dos intermedias, otras dos intermedias y dos muy pequeñas)?

13. ¿Qué puede decir sobre el orden de los genes, tras una simple inspección de las clases fenotípicas y sus frecuencias?

14. ¿Qué tipo de distribución de clases fenotípicas se esperaría si sólo dos de los genes estuvieran ligados?

15. ¿Qué significa la palabra «punto» en un «cruzamiento de prueba de tres puntos»? ¿Implica esa palabra la existencia de ligamiento? ¿Cómo sería un cruzamiento de cuatro puntos?

16. ¿Cuál es la definición de *recombinante* y cómo se aplica aquí?

17. ¿Qué significado tienen las columnas de «Recombinantes entre»?

18. ¿Por qué hay sólo tres columnas del tipo «Recombinantes entre»?

19. ¿Qué significan las R y por qué se han situado donde están?

20. ¿Qué significan los totales de las columnas y cómo se usan en este análisis?

21. ¿Cuál es el criterio para diagnosticar la existencia de ligamiento?

22. ¿Qué es una unidad de mapa? ¿Es lo mismo que un centimorgan?

23. En un cruzamiento de prueba de tres puntos como éste, ¿por qué no son considerados los individuos de la F_1 y los de prueba como los parentales en el cálculo de la recombinación? (En cierto sentido, *son* parentales.)

24. ¿Cuál es la fórmula de la interferencia? ¿Cómo se calculan las frecuencias «esperadas» de la fórmula del coeficiente de coincidencia?

25. ¿Por qué dice la pregunta *c* del problema «en caso de que sea apropiado»?

26. ¿Cuánto trabajo cuesta obtener un número tan grande de descendientes en maíz? ¿Cuántos descendientes, aproximadamente, representa una mazorca?

11. Un individuo heterocigótico para cuatro genes, $A/a \cdot B/b \cdot C/c \cdot D/d$, se cruza con un individuo $a/a \cdot b/b \cdot c/c \cdot d/d$ y se obtienen 1000 descendientes, que se distribuyen como sigue:

$a \cdot B \cdot C \cdot D$	42
$A \cdot b \cdot c \cdot d$	43
$A \cdot B \cdot C \cdot d$	140
$a \cdot b \cdot c \cdot D$	145
$a \cdot B \cdot c \cdot D$	6
$A \cdot b \cdot C \cdot d$	9
$A \cdot B \cdot c \cdot d$	305
$a \cdot b \cdot C \cdot D$	310

a. ¿Qué genes están ligados?

b. Si se utilizaron dos líneas puras para obtener el individuo heterocigótico, ¿cuáles eran los genotipos de dichas líneas puras?

c. Dibuje un mapa de ligamiento de los genes implicados, incluyendo su orden y distancias en unidades de mapa.

d. Si fuera posible, calcule la interferencia.

12. En el pepinillo del diablo, *Ecbballium elaterium*, existen dos sexos separados (es una planta dioica) que no están determinados por cromosomas sexuales heteromorfos, sino por genes específicos. Los alelos de los dos loci implicados en la determinación sexual son *M* (fertilidad masculina), *m* (esterilidad masculina), *F* (esterilidad femenina) y *f* (fertilidad femenina). Los individuos de poblaciones naturales de esta planta pueden ser masculinos (aproximadamente el 50 %) o femeninos (aproximadamente el 50 %). Además, se encuentran individuos hermafroditas, pero con una frecuencia muy baja. El hermafrodita tiene órganos sexuales masculinos y femeninos en la misma planta.

a. ¿Cuál debe ser el genotipo completo de una planta masculina? (Indique la relación de ligamiento entre los genes.)

b. ¿Cuál debe ser el genotipo completo de una planta femenina? (Indique la relación de ligamiento entre los genes.)

c. ¿Cómo se mantiene en la población la misma proporción, aproximadamente, de los dos sexos?

d. ¿Cuál es el origen de los escasos hermafroditas?

e. ¿Por qué son tan poco frecuentes los hermafroditas?

***13.** En la especie humana, el alelo autosómico *N* provoca anormalidades en uñas y rótula, rasgos conocidos como *síndrome uña-rótula*. Considere los matrimonios en los que uno de los individuos padece el síndrome uña-rótula y es de grupo sanguíneo A, y el otro individuo es de grupo sanguíneo O y no padece el síndrome. Estos matrimonios tienen algunos hijos que son de grupo sanguíneo A y padecen el síndrome uña-rótula. Suponga que hijos de ese grupo fenotípico, procedentes de familias no relacionadas, maduran, se casan entre sí y tienen hijos. Entre los descendientes que forman esta segunda generación se observan cuatro fenotipos distintos, en las proporciones siguientes:

síndrome uña-rótula, grupo sanguíneo A	66 %
sin síndrome uña-rótula, grupo sanguíneo O	16 %
sin síndrome uña-rótula, grupo sanguíneo A	9 %
síndrome uña-rótula, grupo sanguíneo O	9 %

Analice estos datos con todo detalle, ofreciendo una explicación de las frecuencias relativas de los cuatro fenotipos.

***14.** Utilizando los datos obtenidos por Bateson y Punnett (Cuadro 5-1), calcule la distancia de mapa (en m.u.) que separan los genes del color y la forma.

15. Disponemos de una línea de *Drosophila* homocigótica para los alelos autosómicos recesivos *a*, *b* y *c*, ligados en ese orden. Cruzamos hembras de esta línea con machos homocigóticos para los alelos silvestres correspondientes. Luego, cruzamos los machos heterocigóticos F_1 con sus hermanas heterocigóticas y obtenemos los siguientes fenotipos en la F_2 (los fenotipos recesivos se indican con letras y los fenotipos silvestres con el signo +): 1364 + + +, 365 *a b c*, 87 *a b* +, 84 + + *c*, 47 *a* + +, 44 + *b c*, 5 *a* + *c* y 4 + *b* +.

***a.** ¿Cuál es la frecuencia de recombinación entre *a* y *b*? ¿Y entre *b* y *c*?

b. ¿Cuál es el coeficiente de coincidencia?

16. R. A. Emerson cruzó dos líneas puras distintas de maíz y obtuvo una F_1 fenotípicamente silvestre y heterocigótica para los tres alelos recesivos siguientes: *an* determina antera; *br* determina braquítico, y *f* determina delgado. Hizo un cruzamiento de prueba entre la F_1 y una variedad homocigótica recesiva para los tres genes, obteniendo estos fenotipos descendientes: 355 anteras; 339 braquíticos y delgados; 88 completamente silvestres; 55 anteras, braquíticos y delgados; 21 delgados; 17 anteras y braquíticos; 2 braquíticos; 2 anteras y delgados.

a. ¿Cuáles eran los genotipos de las líneas parentales?

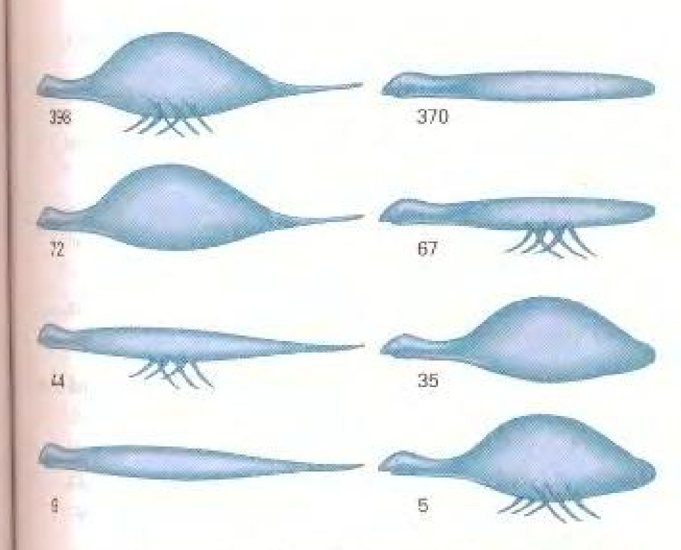
b. Dibuje el mapa de ligamiento de los tres genes (incluya las distancias de mapa).

c. Calcule el valor de la interferencia.

17. El cromosoma 3 del maíz contiene tres loci, con los alelos *b* y b^+, *v* y v^+, y *lg* y lg^+. Los fenotipos recesivos correspondientes se abrevian como *b* (color de la planta intensificado), *v* (planta verdosa) y *lg* (planta sin lígula); los fenotipos silvestres se indican con el signo +. Un cruzamiento de prueba entre plantas de la F_1 heterocigóticas para los tres genes y plantas homocigóticas triple recesivas produjo los siguientes fenotipos descendientes: 305 + *v lg*; 275 *b* + +; 128 *b* + *lg*; 112 + *v* +; 74 + + *lg*; 66 *b v* +; 22 + + +, y 18 *b v lg*. Indique el orden de los genes en el cromosoma, las distancias de mapa entre ellos y el coeficiente de coincidencia.

18. Los grudis son organismos haploides útiles (aunque imaginarios), que se utilizan como instrumentos genéticos. Un grudi silvestre es gordo, de cola larga y con flagelos. Se conocen líneas mutantes delgadas, o sin cola, o que carecen de flagelos. Los grudis se aparean entre sí (aunque son tan vergonzosos que no sabemos cómo lo hacen) y producen recombinantes. Un grudi silvestre se cruza con uno delgado y que carece tanto de cola como de flagelos. Los 1000 cachorros grudi que aparecen se distribuyen según se muestra en la figura de la página siguiente. Asigne símbolos a los genotipos y dibuje el mapa de los tres genes. (Problema 18 por cortesía de Burton S. Guttman.)

19. Suponga que se identifican tres pares de alelos en *Drosophila*: x^+ y *x*, y^+ e *y*, z^+ y *z*. Como indican los símbolos, cada alelo no silvestre es recesivo frente al alelo silvestre. Un cruzamiento entre hembras heterocigóticas para esos



tres loci y machos silvestres produjo la siguiente descendencia, clasificada según los genotipos de los gametos aportados por las hembras: 1010 hembras $x^+ \cdot y^+ \cdot z^+$; 430 machos $x \cdot y^+ \cdot z$; 441 machos $x^+ \cdot y \cdot z^+$; 39 machos $x \cdot y \cdot z$; 32 machos $x^+ \cdot y^+ \cdot z$; 30 machos $x^+ \cdot y^- \cdot z^+$; 27 machos $x \cdot y \cdot z^+$; 1 macho $x^- \cdot y \cdot z$, y 0 machos $x \cdot y \cdot z^-$.

a. ¿En qué cromosoma de *Drosophila* se encuentran estos genes?

b. Dibuje los cromosomas de la hembra parental heterocigótica implicados en los resultados, mostrando en ellos la disposición de los alelos.

c. Calcule las distancias de mapa entre los genes y el coeficiente de coincidencia.

20. A partir de los cinco grupos de resultados de la tabla adjunta, averigüe por mera inspección (esto es, sin calcular frecuencias de recombinación) el orden de los genes. Los fenotipos recesivos se indican con letras minúsculas, y los dominantes con el signo +.

Fenotipos observados en cruzamientos de tres puntos	Conjunto de resultados				
	1	2	3	4	5
+ + +	317	1	30	40	305
+ + *c*	58	4	6	232	0
+ *b* +	10	31	339	84	28
+ *b c*	2	77	137	201	107
a + +	0	77	142	194	124
a + *c*	21	31	291	77	30
a b +	72	4	3	235	1
a b c	203	1	34	46	265

21. En la tabla adjunta aparecen datos fenotípicos de los cruzamientos de prueba de tres puntos, en los que están implicados (1) *a*, *b* y *c*, y (2) *b*, *c* y *d*. Averigüe en qué orden están los cuatro genes, *a*, *b*, *c* y *d*, y las tres distancias de mapa entre ellos. Los fenotipos recesivos se indican con letras minúsculas, y los dominantes con el signo +.

1		2	
+ + +	669	*b c d*	8
a b +	139	*b* + +	441
a + +	3	*b* + *d*	90
+ + *c*	121	+ *c d*	376
+ *b c*	2	+ + +	14
a + *c*	2280	+ + *d*	153
a b c	653	+ *c* +	65
+ *b* +	2215	*b c* +	141

22. En *Drosophila*, el alelo dp^+ determina alas largas y el alelo *dp* alas cortas. En un locus distinto, el alelo e^+ determina cuerpo gris y el *e* cuerpo de color ébano. Ambos loci son autosómicos. Empezando con líneas puras, se realiza el siguiente cruzamiento:

P   largas, ébano ♀ × cortas, gris ♂

F_1 largas, gris ♀ × cortas, ébano ♂ (línea pura)

F_2		
	largas, ébano	54
	largas, gris	47
	cortas, gris	52
	cortas, ébano	47
		200

Utilice la prueba χ^2 para determinar si estos loci están ligados. Para ello, (a) establezca una hipótesis, (b) calcule el valor de χ^2, (c) el valor de *p*, (d) indique qué significa ese valor de *p*, (e) establezca sus conclusiones, y (f) infiera la constitución cromosómica de los parentales, la F_1, los machos de prueba y la descendencia.

23. Para analizar el ligamiento entre varios genes, se han cruzado dos estirpes de levadura haploides, portadora cada una de dos alelos mutantes. La estirpe A lleva los alelos *asp* y *gal*, que provocan requerimiento de aspartato e incapacidad para utilizar la galactosa; la estirpe B lleva los alelos *rad* y *aro*, que provocan sensibilidad a la radiación y requerimiento de aminoácidos aromáticos. Se ha comprobado el genotipo de los descendientes haploides, con el resultado siguiente (los alelos silvestres se indican con el signo +):

Genotipo	Frecuencia
asp · *gal* · + · +	0.136
asp · + · + · *rad*	0.136
asp · *gal* · + · *rad*	0.064
asp · + · + · +	0.064
+ · *gal* · *aro* · +	0.136
+ · + · *aro* · *rad*	0.136
+ · *gal* · *aro* · *rad*	0.064
+ · + · *aro* · +	0.064
asp · *gal* · *aro* · +	0.034
asp · + · *aro* · *rad*	0.034
asp · *gal* · *aro* · *rad*	0.016
asp · + · *aro* · +	0.016
+ · *gal* · + · +	0.034
+ · + · + · *rad*	0.034
+ · *gal* · + · *rad*	0.016
+ · + · + · +	0.016
	1.000

a. Calcule las seis frecuencias de recombinación.

b. Dibuje un mapa de ligamiento que muestre las posiciones de los cuatro loci genéticos, incluyendo las distancias entre ellos, en unidades de mapa.

24. Un genetista coloca juntos una hembra de ratón de una línea pura, silvestre para el color de los ojos y el color del cuerpo, y un ratón macho de ojos de color albaricoque (determinado por el alelo *a*) y pelaje gris (determinado por el alelo *g*). Los roedores aparean y producen una F_1 silvestre. Estos ratones de la F_1 aparean entre sí y producen una F_2 constituida de la siguiente forma:

Hembras	todas silvestres	
Machos	silvestres	45 %
	albaricoque, gris	45 %
	gris	5 %
	albaricoque	5 %

a. Ofrezca una explicación de estos resultados.

b. Indique los genotipos de los parentales y de los dos sexos de la F_1 y la F_2.

25. La madre de una familia de diez hijos es de grupo sanguíneo Rh^+. También manifiesta una rara afección (eliptocitosis, fenotipo E) que hace que los hematíes sean de forma oval, en vez de redondeados, si bien no produce ningún efecto clínico adverso. El padre es Rh^- (carece del antígeno Rh^+) y posee hematíes normales (fenotipo e). Los hijos son: 1 Rh^+ e, 4 Rh^+ E y 5 Rh^- e. Tenemos información sobre los padres de la madre, que son Rh^+ E y Rh^- e. Uno de los diez hijos (de fenotipo Rh^- E) se casa con una mujer Rh^+ e y tienen un hijo Rh^+ E.

a. Dibuje el pedigrí de la familia completa.

b. ¿Está este pedigrí de acuerdo con la hipótesis de que Rh^+ es dominante y Rh^- recesivo?

c. ¿Cuál es la forma de herencia de la eliptocitosis?

***d.** ¿Podrían estar los genes para los fenotipos E y Rh en el mismo cromosoma? Si es así, haga una estimación de la distancia entre dichos genes, comentando su resultado.

26. El padre de Mr. Spock, primer oficial de la nave estelar *Enterprise*, procedía del planeta Vulcano; su madre era de la Tierra. Un habitante de Vulcano tiene las orejas en punta (determinado por el alelo *P*), carece de glándula suprarrenal (determinado por *A*) y tiene el corazón a la derecha (determinado por *R*). Todos estos alelos son dominantes sobre los alelos normales en la Tierra. Los genes correspondientes son autosómicos y están ligados según el mapa siguiente:

P — 15 m.u. — *A* — 20 m.u. — *R*

Si Mr. Spock se casara con una terrícola y no hubiera algún tipo de incompatibilidad (genética), ¿qué proporción de sus hijos:

a. tendrá aspecto vulcano para los tres caracteres?

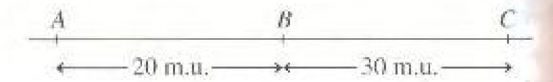
b. tendrá aspecto terrícola para los tres caracteres?

c. tendrá las orejas y el corazón como los vulcanos, y la glándula suprarrenal como los terrícolas?

d. tendrá las orejas como los vulcanos, y el corazón y la glándula suprarrenal como los terrícolas?

(El problema 26 ha sido tomado de D. Harrison, *Problems in Genetics*, Addison-Wesley, 1970.)

27. En cierta planta haploide, hay tres loci, *A*, *B* y *C*, que están ligados de la siguiente manera:



Tiene una planta (llamémosla parental) de genotipo *A b c/a B C*.

a. Suponiendo ausencia de interferencia. Si la planta se autofecunda, ¿qué proporción de la descendencia será de genotipo *a b c/a b c*?

b. En ausencia de interferencia, si la planta parental se cruza con otra de genotipo *a b c/a b c*, ¿qué clases genotípicas se encontrarán entre los descendientes? ¿Cuántos individuos habrá de cada clase en un total de 1000 descendientes?

***c.** Repita el apartado b, suponiendo esta vez una interferencia del 20 % entre las dos regiones.

28. Tras varios cruzamientos del tipo *A/A · B/B × a/a · b/b*, individuos de la F_1 *A/a · B/b*, se utilizaron en cruzamientos de prueba con individuos *a/a · b/b*. Los resultados aparecen en la tabla:

Cruzamiento de prueba con el cruzamiento	DESCENDENCIA DEL CRUZAMIENTO DE PRUEBA			
	A/a · B/b	*a/a · b/b*	*A/a · b/b*	*a/a · B/b*
1	310	315	287	288
2	36	38	23	23
3	360	380	230	230
4	74	72	50	44

Use el análisis de χ^2 para decidir si hay pruebas de ligamiento en cada caso.

29. Ciertas variedades de lino muestran resistencias distintas a estirpes específicas del hongo llamado *roya del lino*. Por ejemplo, la variedad de lino 77OB es resistente a la estirpe 24 del hongo, pero es susceptible al ataque de la estirpe 22, mientras que la variedad Bombay de lino es resistente a la estirpe 22 y susceptible al ataque de la estirpe 24. Cuando se cruzaron las variedades 77OB y Bombay, el híbrido F_1 fue resistente a ambas estirpes del hongo. Al autopolinizar la F_1, se produjo una F_2 que incluía las proporciones fenotípicas que se indican en la tabla.

		RAZA 22 DEL HONGO	
		R	S
RAZA 24 DEL HONGO	R	184	63
	S	58	15

a. Establezca una hipótesis que dé cuenta de las bases genéticas de la resistencia del lino a estas razas particulares del hongo. Desarrolle la hipótesis de manera clara y defina cualquier símbolo genético que emplee. Indique los genotipos que propone para las plantas 77OB, Bombay, F_1 y F_2.

b. Compruebe su hipótesis, utilizando la prueba de χ^2. Indique los valores esperados, el valor de χ^2 (con dos decimales) y el valor correspondiente de la probabilidad, p. Explique exactamente a qué se refiere esta probabilidad. De acuerdo con el valor obtenido para χ^2, ¿acepta o rechaza su hipótesis?

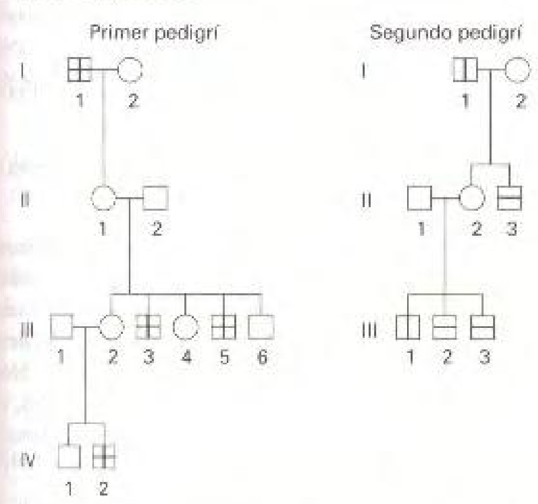
(El problema 29 ha sido adaptado de M. Strickberger, *Genetics*. Macmillan. 1968.)

30. En los dos pedigríes que se muestran, los símbolos con una barra vertical indican deficiencia en la enzima sulfatasa de esteroides, y aquellos con una barra horizontal indican deficiencia en la enzima transcarbamilasa de la ornitina.

a. ¿Hay algún indicio en estos pedigríes de que los genes que provocan las deficiencias estén ligados?

b. Suponiendo que los genes están ligados, ¿hay alguna prueba en los pedigríes de que se haya producido algún entrecruzamiento?

c. Indique el genotipo de estos individuos, con tanto detalle como sea posible.



31. El siguiente pedigrí muestra una familia en la que aparecen dos fenotipos anormales raros: esclerosis azul (debilidad en los huesos), representada mediante símbolos de borde grueso, y hemofilia, representada por símbolos con un cuadrado negro en el centro. Los individuos representados por símbolos completamente negros padecen ambas enfermedades.

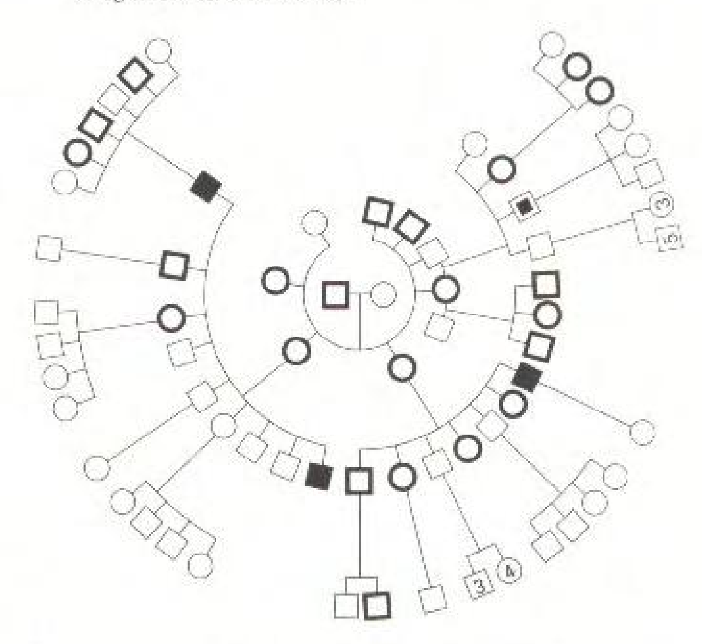
a. ¿Qué forma de herencia muestra cada uno de esos fenotipos en este pedigrí?

b. Indique los genotipos del mayor número posible de miembros de la familia.

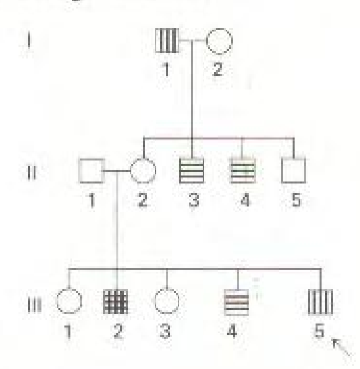
c. ¿Hay pruebas de la existencia de ligamiento?

d. ¿Hay pruebas de segregación independiente?

e. ¿Puede considerarse a algún miembro de la familia como recombinante (esto es, formado a partir de al menos un gameto recombinante)?



32. En el siguiente pedigrí, las rayas verticales indican ceguera para los colores del tipo conocido como protanopía, y las rayas horizontales ceguera para los colores del tipo deuteranopía. Se trata de dos afecciones diferentes que provocan distintos defectos en la percepción de los colores. Cada una se debe a un gen diferente.

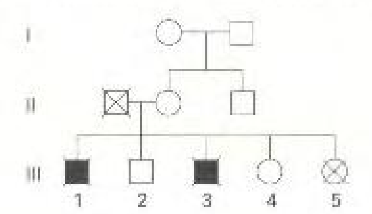


a. ¿Muestra el pedigrí alguna prueba de que los genes están ligados?

b. Si hubiera ligamiento, ¿hay alguna prueba en el pedigrí de que se haya producido algún entrecruzamiento? Explique sus dos respuestas con la ayuda de diagramas.

c. ¿Puede calcular un valor para la frecuencia de recombinación entre estos genes? ¿Se trata de segregación independiente o de entrecruzamiento?

***33.** Los genes humanos de la ceguera para los colores y de la hemofilia están ambos en el cromosoma X, mostrando entre ellos una frecuencia de recombinación aproximada del 10 %. El ligamiento de un gen patológico a otro relativamente inocuo puede utilizarse en el diagnóstico genético. Aquí, aparece parte de un pedigrí más extenso. Los símbolos en oscuro indican que las personas son hemofílicas, y las cruces que sufren de ceguera para los colores. ¿Qué información puede ofrecerse a las mujeres III-4 y III-5 respecto a la probabilidad de que sus hijos varones sean hemofílicos? (Problema 33 adaptado de J. F. Crow, *Genetics Notes: An Introduction to Genetics*, Burgess, 1983.)



34. Un genetista que pretende cartografiar los genes *A*, *B*, *C*, *D* y *E* realiza dos cruzamientos de prueba de tres puntos. El primer cruzamiento entre líneas puras es

$A/A \cdot B/B \cdot C/C \cdot D/D \cdot E/E \times a/a \cdot b/b \cdot C/C \cdot d/d \cdot E/E$

El investigador cruza luego la F_1 con un individuo de prueba, homocigótico recesivo, y clasifica los descendientes según la contribución gamética de la F_1:

$A \cdot B \cdot C \cdot D \cdot E$	316
$a \cdot b \cdot C \cdot d \cdot E$	314
$A \cdot B \cdot C \cdot d \cdot E$	31
$a \cdot b \cdot C \cdot D \cdot E$	39
$A \cdot b \cdot C \cdot d \cdot E$	130
$a \cdot B \cdot C \cdot D \cdot E$	140
$A \cdot b \cdot C \cdot D \cdot E$	17
$a \cdot B \cdot C \cdot d \cdot E$	13
	1000

El segundo cruzamiento entre líneas puras es

$A/A \cdot B/B \cdot C/C \cdot D/D \cdot E/E \times a/a \cdot B/B \cdot c/c \cdot D/D \cdot e/e$

El investigador cruza luego la F_1 de este cruzamiento con un individuo de prueba, homocigótico recesivo, y obtiene

$A \cdot B \cdot C \cdot D \cdot E$	243
$a \cdot B \cdot c \cdot D \cdot e$	237
$A \cdot B \cdot c \cdot D \cdot e$	62
$a \cdot B \cdot C \cdot D \cdot E$	58
$A \cdot B \cdot C \cdot D \cdot e$	155
$a \cdot B \cdot c \cdot D \cdot E$	165
$a \cdot B \cdot C \cdot D \cdot e$	46
$A \cdot B \cdot c \cdot D \cdot E$	34
	1000

Por otro lado, el genetista sabe que los genes *D* y *E* segregan de manera independiente.

a. Dibuje el mapa de estos genes, indicando si es posib las distancias entre ellos en unidades de mapa.

b. ¿Hay algún indicio de interferencia?

35. En *Arabidopsis thaliana*, una crucífera diminuta, se ha de cubierto un nuevo fenotipo glabro (carente de tricomas) q se hereda como un carácter recesivo (*g/g*). Se sospecha q el locus *G* está en el cromosoma 4, de manera que se cru una planta *g/g* y otra de genotipo *y/y* (*yellow*, color ama llo debido a una reducción en la cantidad de clorofila Sabemos que el locus *Y* está en el cromosoma 4. Al autop linizar la F_1 de fenotipo silvestre, se obtiene la siguiente F

silvestre	514
amarillo	237
glabro	234
amarillo, glabro	15
Total	1000

a. ¿Está el locus *G* en el cromosoma 4?

b. Si ha respondido afirmativamente a la anterior pr gunta, calcule a cuántas unidades de mapa está del locus

c. Explique las frecuencias en que aparecen las clase amarillo y glabro de la F_2.

36. En la planta *Arabidopsis*, los loci para la longitud del fru (*L*, largo; *l*, corto) y la presencia de pelos en éste (*H*, fru peludo; *h*, fruto pelado) están ligados al mismo cromos ma, separados por una distancia de 16 unidades de ma Se hicieron los cruzamientos siguientes:

(i) $L\ H/L\ H \times l\ h/l\ h \rightarrow F_1$
(ii) $L\ h/L\ h \times l\ H/l\ H \rightarrow F_1$

Si se cruzan las dos F_1

a. ¿Qué proporción de la descendencia se espera que *l h/l h*?

b. ¿Qué proporción de la descendencia se espera que *L h/l h*?

37. En el maíz, se ha obtenido un triple heterocigoto que lle los alelos *s* (seco), *w* (aleurona blanca) e *y* (endospern ceroso), emparejados con sus respectivos alelos silvestre El triple heterocigoto se somete a cruzamiento de prue obteniéndose una descendencia de 116 secos, blancos completamente silvestres; 2538 secos; 601 secos, ceros 626 blancos; 2708 blancos, cerosos; 2 secos, blancos, cer sos y 113 cerosos.

a. Determine si alguno de estos tres loci están ligados; si lo están, calcule las distancias de mapa.

b. Muestre el orden de los alelos en los cromosomas d triple heterocigoto empleado en el cruzamiento de prueb

c. Calcule la interferencia, si resulta apropiado.

38. Los loci *A* y *B* están ligados, estando separados por u distancia de 10 unidades de mapa. Demuestre que, ta como se muestra en el Cuadro 5-2, al cruzar entre sí indi

duos dihíbridos en fase de repulsión (*A b/a B*), el valor *z* será de 0,002.

39. a. Se hizo, con ratones, el cruzamiento *A/a · B/b × a/a · b/b* y se obtuvo la descendencia

25 % *A/a · B/b*, 25 % *a/a · b/b*
25 % *A/a · b/b*, 25 % *a/a · B/b*

Explique estos resultados, ayudándose de diagramas simplificados de la meiosis.

b. Se hizo, con ratones, el cruzamiento *C/c · D/d × c/c · d/d* y se obtuvo la descendencia

45 % *C/c · d/d*, 45 % *c/c · D/d*
5 % *c/c · d/d*, 5 % *C/c · D/d*

Explique estos resultados, ayudándose de diagramas simplificados de la meiosis.

40. En *Arabidopsis*, una planta de porte pequeño, el alelo recesivo *hyg* confiere resistencia de la semilla a la droga higromicina, y *her*, un alelo recesivo de un gen distinto, confiere resistencia de la semilla a herbicida. Se cruzó una planta homocigótica *hyg/hyg · her/her* con el silvestre, y se dejó que la F_1 se autopolinizara. Las semillas resultantes de la autopolinización de la F_1 se colocaron en placas de petri que contenían higromicina y herbicida.

a. Si los dos genes no están ligados, ¿qué porcentaje de semillas esperamos que germinen?

b. Suponga que han germinado un 13 % de las semillas. ¿Apoya este porcentaje la hipótesis de ausencia de ligamiento? Explíquelo. Si no lo apoya, calcule cuántas unidades de mapa separan los dos loci.

c. Siguiendo su hipótesis. Si se somete la F_1 a cruzamiento de prueba, ¿qué proporción de las semillas germinará en el medio que contiene higromicina y herbicida?

41. En el maíz (*Zea mays*), el mapa genético del cromosoma 4 es tal y como se representa debajo, donde *w*, *s* y *e* representan alelos recesivos mutantes que afectan al color y a la forma del polen.

w —— 8 m.u. —— *s* —— 14 m.u. —— *e*

Si se realiza el cruzamiento siguiente

+ + +/+ + + × w s e/w s e

y se somete la F_1 a un cruzamiento de prueba con *w s e/w s e*, suponiendo que no hay interferencia en esta región del cromosoma, ¿qué proporción de la descendencia será de genotipo

a. *+ + +*?
b. *w s e*?
c. *+ s e*?
d. *w + +*?
e. *+ + e*?
f. *w s +*?
g. *w + e*?
h. *+ s +*?

42. En el mosquito, *Anopheles*, los loci para el color de los ojos (alelos *B*, negro; *b*, blanco) y la longitud del cuerpo (*L*, largo; *l*, corto) están ligados, existiendo entre ellos una distancia de 20 m.u. Se hace un cruzamiento entre dos dihíbridos, uno en fase de acoplamiento y el otro en la de repulsión. ¿Qué fenotipos se obtendrán en la descendencia y en qué proporciones?

43. Una planta de genotipo *Q/q · R/r · T/t* produce los genotipos gaméticos siguientes, en las proporciones que se indican

Q · R · T	$\frac{1}{8}$
Q · R · t	$\frac{1}{8}$
q · R · T	$\frac{1}{8}$
Q · r · T	$\frac{1}{8}$
q · r · t	$\frac{1}{8}$
Q · r · t	$\frac{1}{8}$
q · R · t	$\frac{1}{8}$
q · r · T	$\frac{1}{8}$

Dibuje diagramas de la meiosis en los que se explique con claridad cómo se obtienen estas proporciones gaméticas. Como parte de su respuesta, muestre los cromosomas (1) antes de la fase premeiótica S (fase de replicación); (2) después de la formación de las cromátidas; (3) cuando están emparejados; (4) durante la anafase I; y (5) durante la anafase II.

44. En las judías, alto (*T*) domina sobre corto (*t*), flores rojas (*R*) domina sobre flores blancas (*r*) y hojas anchas (*W*) domina sobre hojas estrechas (*w*). Se hizo el cruzamiento siguiente, obteniéndose la descendencia que se muestra:

Cruzamiento	alto, roja, ancha × corto, blanca, estrecha
Descendencia	478 alto, blanca, ancha
	21 alto, roja, ancha
	19 corto, blanca, ancha
	482 corto, roja, ancha

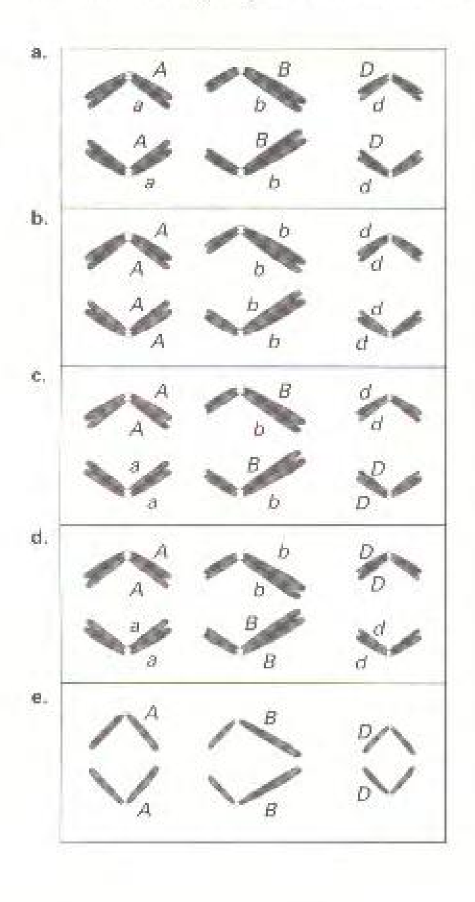
a. Explique por qué se obtuvieron estos fenotipos en la descendencia y en las proporciones observadas (enumere todos los genotipos y muestre las posiciones de los genes en los cromosomas).

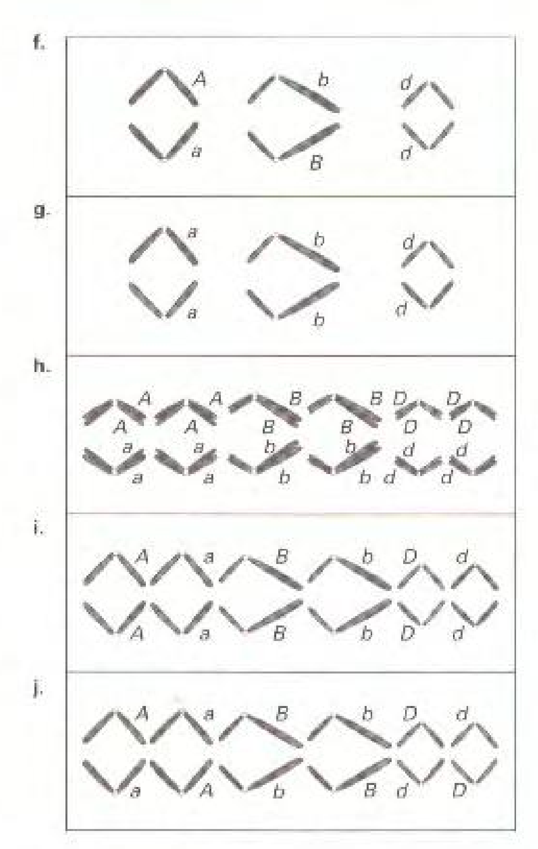
b. Siguiendo su hipótesis. Si se deja autopolinizar el parental alto, roja, ancha, ¿cuál será la proporción de la descendencia corto, blanca, ancha?

45. En el pedigrí de la Figura 5-19, calcule la puntuación Lod para una frecuencia de recombinación del 34 %.

46. En un organismo diploide de genotipo *A/a ; B/b ; D/d*, los genes están en parejas de cromosomas homólogos diferentes. Los diagramas siguientes pretenden mostrar anafases

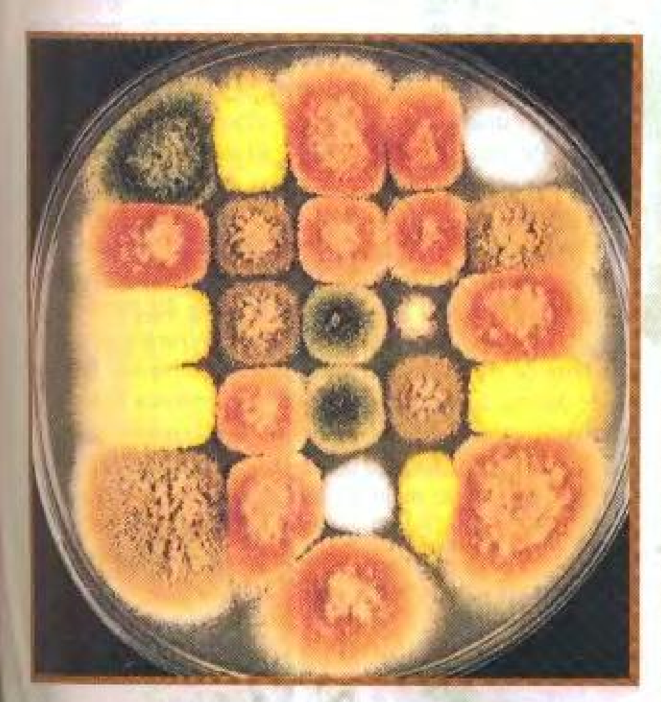
(fase de separación de los cromosomas o cromátidas) en células individuales. Una línea representa un cromosoma o una cromátida, y el punto blanco indica la posición del centrómero. Diga, para cada genotipo concreto, si el dibu[jo] representa la mitosis, la meiosis I, la meiosis II o si es im[posible] determinarlo.





6

TÉCNICAS ESPECIALES PARA ELABORAR MAPAS CROMOSÓMICOS EN EUCARIOTAS



Algunas variantes de la coloración del hongo ascomiceto *Aspergillus*, cuyo color normal es verde oscuro. Los alelos responsables de estas variantes de color son marcadores muy útiles en el estudio de la recombinación mitótica, uno de los aspectos tratados en este capítulo. Las variantes de color se deben normalmente a pigmentos intermediarios de la secuencia de reacciones bioquímicas que termina en el pigmento verde oscuro. *(J. Peberdy, Department of Life Sciences, University of Nottingham, England.)*

Ideas fundamentales

Los entrecruzamientos dobles y múltiples hacen que se subestimen las distancias de mapa calculadas a partir de las frecuencias de recombinación.

Ciertas fórmulas cartográficas permiten corregir el efecto de los entrecruzamientos múltiples y obtener distancias de mapa precisas.

El análisis de muchas meiosis individuales que puede realizarse en hongos permite determinar la posición de los centrómeros en los mapas genéticos.

El análisis de meiosis individuales permite indagar en los mecanismos responsables de la segregación de genes y la recombinación que actúan en la meiosis.

A veces, los cromosomas recombinan durante la mitosis de células diploides.

La unión del DNA de genes clonados a posiciones específicas de los cromosomas permite determinar la posición de los genes en el mapa.

La localización de los genes humanos en sus cromosomas puede determinarse mediante la utilización de híbridos celulares somáticos hombre-ratón.

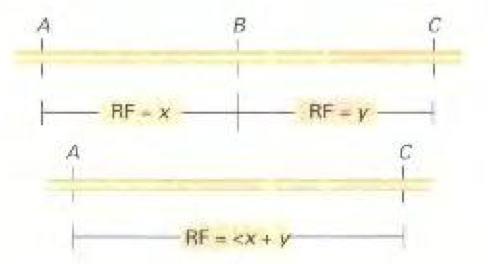
En el Capítulo 5 hemos considerado el procedimiento básico para cartografiar los cromosomas eucarióticos. De acuerdo con ese procedimiento, el investigador mide la *frecuencia de recombinantes* en una *muestra aleatoria* de productos de la *meiosis* y, a partir de ella, determina el grado de ligamiento de los genes en cuestión. En este capítulo, profundizaremos en el estudio de estos tres conceptos fundamentales: frecuencia de recombinación, productos meióticos escogidos al azar y mitosis.

En primer lugar, trataremos la *frecuencia de recombinación*. Veremos que la medida de la frecuencia de los recombinantes no siempre estima de forma apropiada la distancia de mapa, y es necesario en esos casos realizar algunas correcciones. En segundo lugar, *los productos escogidos al azar*. Algunos organismos, debido a la forma en que llevan a cabo su ciclo de vida, permiten al investigador estudiar los productos de meiosis individuales, haciendo posible una visión de la recombinación que no es posible si se estudian productos meióticos escogidos al azar; y en tercer lugar, *la meiosis*. Puede resultar sorprendente que nos digan que los genes recombinan también en mitosis. Esto abre la vía a ciertos métodos cartográficos aplicables a esos casos.

Cartografiar cromosomas es una de las principales tareas de los genetistas. Después de todo, el objetivo de estos investigadores es entender la estructura, función y evolución del genoma, y saber dónde están situados los genes es parte fundamental de esta tarea. Los conceptos de este capítulo forman parte del vocabulario diario de los genetistas. De la misma manera que antes ampliamos las reglas básicas de Mendel sobre segregación, ahora ampliaremos las normas básicas sobre cartografía genética.

Cálculo preciso de distancias de mapa largas

En el Capítulo 5, estudiamos que el procedimiento genético básico para medir distancias de mapa se basaba en la frecuencia de recombinación (RF). Una unidad de mapa (m.u.) se definió como una frecuencia de recombinación del 1 %. Se trata de una unidad fundamental muy útil que ha resistido el paso del tiempo y todavía sigue empleándose en Genética. No obstante, cuanto mayor es la frecuencia de recombinación, menos precisa resulta como medida de la distancia de mapa. De hecho, el número de unidades de mapa calculado a partir de frecuencias de recombinación altas resulta menor que el número de unidades de mapa calculado a partir de frecuencias de recombinación más bajas. Tropezamos con este efecto en algunos ejemplos del Capítulo 5. En un caso típico, cuando se miden las frecuencias de recombinación entre tres loci ligados, la suma de las dos frecuencias de



recombinación internas es mayor que la frecuencia de recombinación entre los loci más alejados. Con esta información, ¿cuál sería la estimación más precisa de la distancia de mapa entre los loci *A* y *C* del diagrama anterior?

La respuesta es que $x + y$ es la mejor estimación, y más precisa que el valor más pequeño que se obtiene calculando directamente la distancia de mapa entre *A* y *C*. Esto nos ofrece el siguiente principio cartográfico útil:

COROLARIO

La mejor estimación de la distancia de mapa entre dos loci se obtiene sumando las distancias calculadas para subintervalos más cortos.

Sin embargo, ¿qué ocurre si no contamos con marcadores intermedios que nos permitan medir la frecuencia de recombinación en intervalos cortos? Esta situación sería normal al iniciar la cartografía genética de un nuevo organismo experimental o en aquellos casos en los que el genoma es enorme, como ocurre con el de los seres humanos. Por ejemplo, ¿qué pasaría si en el diagrama anterior no se hubiera conocido la existencia del locus *B*? ¿Tendríamos que apañarnos con el valor de la distancia de mapa obtenido directamente de la frecuencia de recombinación *A*-*C*? Además, ¿qué ocurre con las propias distancias cortas? Si hubiera otros loci entre *A* y *B* y entre *B* y *C*, podríamos obtener mejores estimaciones de la distancia entre *A* y *C*. Afortunadamente, existe un método que permite tomar cualquier frecuencia de recombinación y, realizando ciertos cálculos, convertirla en una medida precisa de la distancia de mapa correspondiente, sin necesidad de estudiar intervalos más cortos.

Antes de pasar a esos cálculos, meditemos sobre las causas que determinan que valores altos de RF constituyan medidas poco precisas de las distancias de mapa. Ya conocemos a los culpables: los entrecruzamientos múltiples. En el Capítulo 5, vimos que los entrecruzamientos dobles producen a menudo una disposición de alelos que corresponde a la del parental y, por tanto, los productos meióticos resultantes no se toman en cuenta a la hora de medir la frecuencia de recombinación. Lo mismo puede decirse de otros tipos de entrecruzamientos múltiples: triples, cuádruples, etc. Así que resulta fácil comprender que los entrecruzamientos múltiples llevan automáticamente a subestimar la distancia de mapa y, debido a que se espera que sean relativamente más frecuentes conforme aumenta la distancia, podemos comprender por qué el problema es más grave cuando las frecuencias de recombinación son más altas.

¿Cómo podemos tener en cuenta estos entrecruzamientos múltiples a la hora de calcular las distancias de mapa? Necesitamos una función matemática que establezca una relación precisa entre recombinación y distancia de mapa. En otras palabras, necesitamos una **función de mapa**.

COROLARIO

Una función de mapa es una fórmula que, empleando frecuencias de recombinación, calcula la distancia de mapa en la que se ha corregido el efecto de los entrecruzamientos múltiples.

La distribución de Poisson

Para obtener la función de mapa, necesitamos una herramienta matemática que se utiliza frecuentemente en el análisis genético, ya que es útil para describir muchos tipos diferentes de procesos genéticos. Esta herramienta matemática es la **distribución de Poisson**. Una distribución es simplemente una descripción de las frecuencias con que aparecen las diferentes clases de una muestra. La distribución de Poisson describe la frecuencia de las clases con 0, 1, 2, 3, 4, ···, *i* sucesos, cuando se conoce el número medio de sucesos por muestra. La distribución de Poisson es especialmente útil cuando el número medio de sucesos es pequeño en relación con el número total de sucesos posibles. Por ejemplo, el número posible de renacuajos que podrían obtenerse al sumergir una red una sola vez en un estanque es bastante elevado, pero la mayoría de las veces se capturan solamente uno, dos o ninguno. El número de pájaros muertos al lado de una carretera podría ser muy elevado, pero en una muestra que cubra una milla, el número suele ser pequeño. La distribución de Poisson describe bien este tipo de muestreos.

Consideremos un ejemplo numérico. Supongamos que se distribuyen aleatoriamente 100 billetes de un dólar a 100 alumnos en un aula, dejándolos caer desde algún punto cercano al techo. El número promedio (o media) de billetes por alumno es 1.0, pero el sentido común nos dice que es muy poco probable que cada alumno capture un billete. Cabe esperar que sólo algunos alumnos afortunados cojan 3 ó 4 billetes cada uno y que muy pocos capturen dos billetes. No obstante, se espera que la mayoría de los estudiantes consigan un billete o ninguno. La distribución de Poisson permite predecir cuantitativamente estos resultados.

En este ejemplo, el suceso que se debe considerar es la captura de un billete por un alumno. Hay que dividir los alumnos en clases según el número de billetes conseguidos por alumno y, a continuación, calcular la frecuencia de cada clase. Sea *m* el número medio de sucesos (en este caso, $m = 1.0$ billete por alumno). Sea *i* el número de sucesos para una clase concreta (por ejemplo, $i = 3$ para aquellos alumnos que consiguen 3 billetes cada uno). Sea $f(i)$ la frecuencia de la clase con *i* sucesos, es decir, la proporción de los 100 alumnos que capturan *i* billetes. La fórmula general para la distribución de Poisson es

$$f(i) = \frac{e^{-m}\, m^i}{i!}$$

donde *e* es la base del logaritmo neperiano (*e* es aproximadamente 2.7) y ! es el símbolo del factorial. Como ejemplo, $3! = 3 \times 2 \times 1 = 6$ y $4! = 4 \times 3 \times 2 \times 1 = 24$. Por definición, $0! = 1$. Cuando se calcule $f(0)$, hay que tener en cuenta que cualquier número elevado a la potencia 0 se define como 1. El Cuadro 6-1 contiene los valores de e^{-m} para valores de *m* desde 0.000 hasta 1.000. Los valores para *m* mayor de 1 pueden obtenerse realizando algunos cálculos.

En nuestro ejemplo, $m = 1.0$. Usando el Cuadro 6-1 podemos calcular las frecuencias de las clases constituidas por alumnos que capturan 0, 1, 2, 3 y 4 billetes, de la siguiente forma:

$$f(0) = \frac{e^{-1}\, 1^0}{0!} = \frac{e^{-1}}{1} = 0.368$$

$$f(1) = \frac{e^{-1}\, 1^1}{1!} = \frac{e^{-1}}{1} = 0.368$$

$$f(2) = \frac{e^{-1}\, 1^2}{2!} = \frac{e^{-1}}{2 \times 1} = \frac{e^{-1}}{2} = 0.184$$

$$f(3) = \frac{e^{-1}\, 1^3}{3!} = \frac{e^{-1}}{3 \times 2 \times 1} = \frac{e^{-1}}{6} = 0.061$$

$$f(4) = \frac{e^{-1}\, 1^4}{4!} = \frac{e^{-1}}{4 \times 3 \times 2 \times 1} = \frac{e^{-1}}{24} = 0.015$$

La Figura 6-1 es un histograma de esta distribución. Podemos predecir que alrededor de 37 alumnos se quedarán sin billetes, unos 37 capturarán un billete, unos 18 capturarán 2 billetes, alrededor de 6 capturarán 3 billetes y cerca de 2 conseguirán 4 billetes. Los 100 alumnos estarían incluidos en alguna de estas cuatro clases. De hecho, se puede comprobar que la distribución de Poisson para $f(5) = 0.003$, lo que indica la escasa probabilidad de que algún alumno recoja 5 billetes.

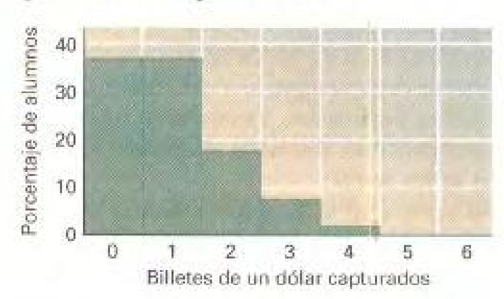


Figura 6-1. Distribución de Poisson para una media de 1.0, ilustrada en términos de una distribución aleatoria de billetes de un dólar entre los alumnos de una clase.

Se pueden generar distribuciones similares para otros valores de *m*. Algunas aparecen en la Figura 6-2 como curvas en lugar de como histogramas de barras.

CUADRO 6-1. Valores de e^{-m} para valores de *m* desde 0 a 1*

m	e^{-m}	*m*	e^{-m}
0.000	1.00000	0.550	0.57695
0.050	0.95123	0.600	0.54881
0.100	0.90484	0.650	0.52205
0.150	0.86071	0.700	0.49659
0.200	0.81873	0.750	0.47237
0.250	0.77880	0.800	0.44933
0.300	0.74082	0.850	0.42741
0.350	0.70469	0.900	0.40657
0.400	0.67032	0.950	0.38674
0.450	0.63763	1.000	0.36788
0.500	0.60653		

*Los valores para *m* mayor de 1 pueden obtenerse utilizando una calculadora o logaritmos.

Fuente: F. James Rohlf y Robert R. Sokal, *Statistical Tables*, 3.ª ed. W. H. Freeman and Co, 1995.

Deducción de la función de mapa

La distribución de Poisson puede describir también la distribución de entrecruzamientos a lo largo de un cromosoma durante

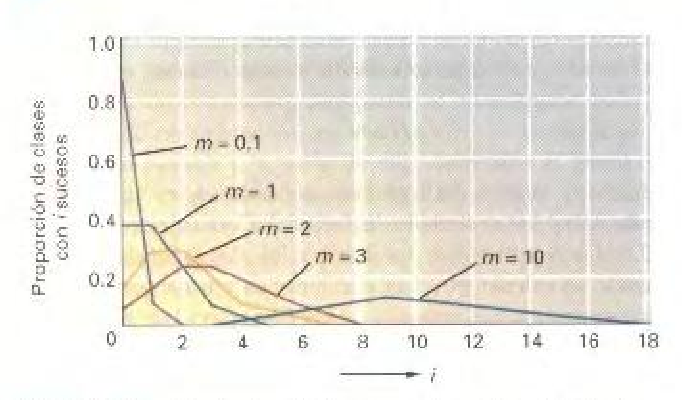


Figura 6-2. Distribuciones de Poisson para cinco valores distintos de la media: m es el número medio de sucesos por muestra e i es el número real de sucesos por muestra. (Según R. R. Sokal y F. J. Rohlf, *Introduction to Biostatistics*. W. H. Freeman and Company, 1973).

la meiosis. Probablemente, el número real de entrecruzamientos en cualquier región cromosómica es bajo, si se compara con el número total de entrecruzamientos posibles en esa región. Si los entrecruzamientos se distribuyeran aleatoriamente (es decir, sin interferencia), y conociéramos el número de entrecruzamientos por meiosis en esa región, podríamos calcular la distribución de meiosis con cero, uno, dos, tres, cuatro o más entrecruzamientos múltiples. Este cálculo no es necesario en el presente contexto, porque, como veremos, la única clase que es realmente importante es la clase cero. Esto es así porque pretendemos establecer una correlación entre distancias de mapa y valores observables de la RF. Resulta que las meiosis en las que haya uno, dos, tres, cuatro, o cualquier número finito de entrecruzamientos, se comportan todas de manera semejante, en tanto que producen una RF del 50% entre los productos de tales meiosis, mientras que las meiosis sin entrecruzamientos producen una RF del 0%. Para ilustrar la veracidad de esta afirmación, considere una serie de meiosis en las que ocurran cero, uno o dos entrecruzamientos entre cromátidas no hermanas, como se muestra en la Figura 6-3. Obtendremos productos recombinantes sólo en las meiosis en las que haya ocurrido al menos un hecho de recombinación en la región, y en ese caso, siempre la mitad exacta de los productos meióticos son recombinantes. Vemos, pues, que el determinante real del valor de RF es el tamaño relativo de la clase cero con respecto al de las demás.

Como se aprecia en la Figura 6-3, hemos tenido en cuenta sólo los entrecruzamientos entre cromátidas no hermanas; pues se piensa que el intercambio entre cromátidas hermanas ocurre rara vez en la meiosis. Si ocurrieran, puede demostrarse que no tendrían efecto neto en la mayoría de los análisis meióticos.

Al fin podemos deducir la función de mapa. Los recombinantes constituyen la mitad de los productos de aquellas meiosis en las que haya ocurrido al menos un entrecruzamiento. La proporción de meiosis con al menos un entrecruzamiento es 1 menos la fracción de cero entrecruzamientos. La frecuencia de esta clase cero será

$$\frac{e^{-m} m^0}{0!}$$

que es igual a

$$e^{-m}$$

Así que la función de mapa puede enunciarse como

$$RF = \tfrac{1}{2}(1 - e^{-m})$$

Esta fórmula relaciona la frecuencia de recombinación con m, el número medio de entrecruzamientos. Debido a que la idea de cartografía genética está basada en la existencia de entrecruzamientos, así como en la proporcionalidad entre la frecuencia de éstos y el tamaño físico de una región cromosómica, puede comprender fácilmente que m sea, probablemente, el parámetro m

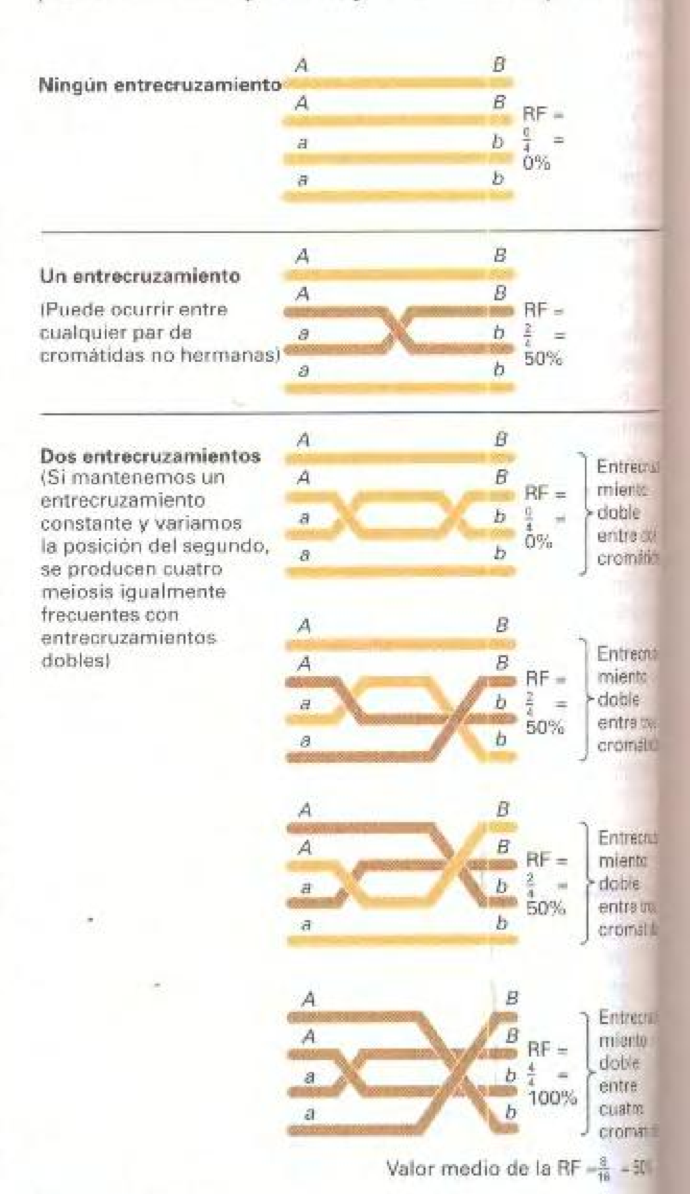


Figura 6-3. Demostración de que en las meiosis en las que el número de entrecruzamientos no es cero, el valor medio de la RF es el 50%. Las cromátidas recombinantes se muestran en marrón. Los entrecruzamientos dobles con participación de dos cromátidas producen sólo tipos parentales, de ahí que ambas cromátidas estén en ocre. Advierta que todos los entrecruzamientos se producen entre cromátidas no hermanas. Intente realizar usted mismo el esquema correspondiente a los entrecruzamientos triples.

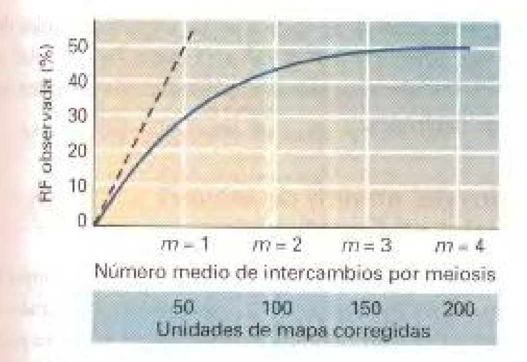


Figura 6-4. La línea azul es una representación gráfica de la función de mapa. En el tramo en que coinciden la línea roja y la línea discontinua, la función es lineal y los valores de RF observados estiman bien las distancias de mapa.

importante de este proceso. De hecho, m puede considerarse como la unidad genética de mapa esencial.

Si conocemos un valor de RF, podemos calcular m, resolviendo la ecuación anterior. Después de obtener muchos valores de m podemos representar la función en una gráfica, como se hace en la Figura 6-4. La observación de la representación gráfica de la función debe ayudarnos a comprender cómo se comporta. En primer lugar, advierta que la función es lineal en cierto intervalo, que corresponde a valores muy pequeños de m. (Recuerde que el valor de m es nuestra mejor estimación de distancia genética). Por tanto, la RF es una buena medida de distancia en el intervalo de la Figura 6-4 en el que la línea discontinua coincide con la función. En esta región, la unidad de mapa definida como una RF del 1 % tiene sentido real. Así pues, utilicemos esa parte de la curva para definir una unidad de mapa corregida, analizando algunos valores pequeños de m:

Para $m = 0.05$, $e^{-m} = 0.95$, y
$$RF = \tfrac{1}{2}(1 - 0.95) = \tfrac{1}{2}(0.05) = \tfrac{1}{2} \times m$$

Para $m = 0.10$, $e^{-m} = 0.90$, y
$$RF = \tfrac{1}{2}(1 - 0.90) = \tfrac{1}{2}(0.10) = \tfrac{1}{2} \times m$$

Vemos que $RF = \frac{m}{2}$, y ésta es la relación que define la línea discontinua de la Figura 6-4. Ella nos permite traducir valores de m en unidades de mapa corregidas. Expresando m como porcentaje, vemos que un valor de m del 100 % (= 1) es equivalente a 50 unidades de mapa corregidas. Por tanto, podemos expresar el eje horizontal de la Figura 6-4 en estas nuevas unidades de mapa. Ahora podemos ver en la gráfica que dos loci separados por 150 unidades de mapa corregidas muestran una RF de sólo el 50 %. La gráfica de la función de mapa puede emplearse para convertir cualquier RF en distancia de mapa, trazando simplemente una línea horizontal desde el valor de RF hasta la curva, y trazando luego la perpendicular desde el punto de corte hasta el eje de las unidades de mapa —proceso equivalente a resolver la ecuación $RF = \frac{1}{2}(1 - e^{-m})$ para m—.

Consideremos un ejemplo numérico del uso de la función de mapa. Suponga que obtiene una RF del 27.5 %. ¿Cuántas unidades de mapa corregidas representa ese valor? A partir de la función:

$$0.275 = \tfrac{1}{2}(1 - e^{-m})$$
$$0.55 = 1 - e^{-m}$$

Por tanto:

$$e^{-m} = 1 - 0.55 = 0.45$$

En las tablas de valores de e^{-m} (o mediante calculadora) comprobaremos que $m = 0.8$, valor que equivale a 40 unidades de mapa corregidas. Si nos hubiéramos contentado con el valor de RF del 27.5 %, habríamos subestimado considerablemente la distancia entre los loci.

COROLARIO

Para estimar las distancias de mapa de forma precisa, hay que hacer pasar los valores de RF por la función de mapa. Alternativamente, hay que sumar el valor de varias distancias tan cortas que correspondan a la región donde la función de mapa es lineal.

Una conclusión del segundo enunciado de este corolario es que en aquellos organismos cuyos cromosomas ya están bien cartografiados, como *Drosophila*, rara vez es necesario acudir a la función de mapa parta cartografiar nuevos genes. Esto es así porque el mapa está ya dividido en muchas regiones pequeñas, marcadas por loci conocidos. Sin embargo, si se está empezando el proceso de cartografía genética de un nuevo organismo, o si los marcadores genéticos de que se disponen están muy dispersos, son necesarias las correcciones que permite la función de mapa.

Advierta que no importa cuán lejos se encuentren dos loci en un cromosoma; nunca observaremos un valor de RF mayor del 50 %. Por tanto, un valor de RF del 50 % nos deja con la duda de si los dos loci están ligados o se encuentran en cromosomas distintos. Dicho de otra manera, conforme m se hace más grande, e^{-m} se hace más pequeño y la RF se aproxima a $\frac{1}{2}(1 - 0) = \frac{1}{2} \times 1 = 0.5$, ó 50 %. Éste es un punto importante: nunca se observan valores de RF del 100 %, no importa cuán separados estén los loci.

Análisis de meiosis individuales

En el Capítulo 5 nos encontramos con un tipo de organismo en el que los productos de cada meiosis permanecen juntos como grupos de cuatro células llamados **tétradas**, término derivado de la palabra griega para el número cuatro. El análisis de tétradas puede realizarse sólo en ciertos hongos y algas unicelulares. En los hongos similares a los champiñones (Basidiomicetes) una meiosis produce un grupo de cuatro basidiosporas: esporas que caen a la tierra desde el sombrerillo. En Ascomicetes como levaduras y mohos, los productos de una única meiosis quedan encerrados en un saco llamado **asca**. Las esporas del asca se denominan *ascosporas*. El alga unicelular *Chlamydomonas* presenta una estructura similar al asca. Basidiosporas, ascosporas y las esporas equivalentes del alga son tipos de **esporas sexuales**.

Ventajas de los organismos haploides para el análisis genético

Para comenzar, advierta que hongos y algas unicelulares son eucariotas microbianos. Esto significa que, como los microbios procariotas (las bacterias), pueden propagarse de forma fácil y económica, ocupan poco espacio y pueden analizarse en gran número. Estas propiedades son útiles en investigación genética. Además, recuerde que hongos y algas son haploides. La haploidía tiene dos ventajas fundamentales en estudios genéticos. En primer lugar, debido a que poseen sólo una copia de cada cromosoma, las relaciones de dominancia y recesividad no complican la expresión génica, de manera que el fenotipo es una manifestación directa del genotipo. En segundo lugar, además del análisis de tétradas, incluso el estudio de productos meióticos tomados al azar resulta más fácil que con diploides. Recuerde que en el ciclo de vida haploide, dos células parentales haploides se fusionan para formar el meiocito diploide, cuya meiosis es la única de la que debe preocuparse el genetista. Por el contrario, en los diploides hay que tener en cuenta la meiosis de cada uno de los progenitores. Como ejemplo, veamos lo fácil que resulta estudiar ligamiento en haploides usando productos meióticos tomados al azar. Podemos hacer un cruzamiento del tipo $a^+ \cdot b^+ \times a \cdot b$ y analizar una muestra aleatoria de productos meióticos. Esta estrategia es sencilla, porque de cada producto se desarrolla directamente un individuo descendiente haploide. Podríamos encontrar las siguientes frecuencias genotípicas entre los descendientes:

$a^+ \cdot b^+$	45%
$a \cdot b$	45%
$a^+ \cdot b$	5%
$a \cdot b^+$	5%

A partir de este tipo de datos, resulta sencillo determinar qué descendientes presentan genotipo parental (las dos clases primeras) y cuáles recombinante (las dos clases últimas). También es fácil calcular el valor de la RF del 10%, que indica que estos genes están ligados y separados por una distancia de 10 unidades de mapa.

Es interesante destacar en este momento que la tecnología molecular ha hecho posible analizar productos haploides de la meiosis en humanos. Como se indicó en el Capítulo 5, los sitios de variación neutra en el DNA pueden detectarse mediante el uso de sondas moleculares, y los «dihíbridos» de esos sitios pueden utilizarse para estudiar la recombinación entre ellos. Por ejemplo, muestras de esperma pueden diluirse hasta conseguir una célula por tubo. El DNA de un espermatozoide es suficiente para llevar a cabo un análisis rutinario de variantes «alélicas» neutras. Para analizar un sitio específico, en primer lugar, el DNA que engloba dicho sitio debe amplificarse, empleando un proceso especial llamado *reacción en cadena de la polimerasa* (véase el Cap. 12). Asumamos que un hombre es heterocigótico para los sitios que llamaremos *DNA-P* y *DNA-Q*. Su genotipo puede designarse:

$$DNA\text{-}P' \cdot DNA\text{-}P'' \cdot DNA\text{-}Q' \cdot DNA\text{-}Q''$$

Sus espermatozoides serán:

$$DNA\text{-}P' \cdot DNA\text{-}Q'$$
$$DNA\text{-}P' \cdot DNA\text{-}Q''$$
$$DNA\text{-}P'' \cdot DNA\text{-}Q'$$
$$DNA\text{-}P'' \cdot DNA\text{-}Q''$$

Y la frecuencia relativa de cada tipo de espermatozoides determinará si los sitios *DNA-P* y *DNA-Q* están ligados. Así, para algunos loci, los humanos pueden analizarse con la misma facilidad que los haploides.

Beneficios del análisis de meiosis individuales en Genética

Como se comentó anteriormente, una característica importan de algunas especies haploides es que producen tétradas q permiten el estudio de meiosis individuales. Quizás se pregu te por qué es importante el estudio de meiosis individuale después de todo, en los capítulos anteriores ya hemos desarro llado algunas de las reglas básicas de la Genética sin acudir estos estudios. La primera respuesta es que, al estudiar meio individuales, los genetistas pueden observar directamente comportamiento de los genes en los procesos meióticos, s necesidad de muchas inferencias. Considere, por ejemplo, inferencia que implícitamente hacemos cuando estudiamos segregación de alelos de un heterocigoto, digamos *A/a*. Cuand observamos igual número de alelos *A* y *a* en una muestra azar de gametos, los atribuimos a la segregación de los cr mosomas homólogos portadores de *A* y *a* en las meiosis ind *viduales*. Sin embargo, ésta es una inferencia que no pued confirmarse directamente en la mayoría de los organism eucarióticos. El análisis de tétradas muestra directamente qu esa segregación ocurre. Este carácter directo resulta de util dad para la investigación genética. Además, las tétradas pe miten varios tipos de estudios que no serían posibles con análisis convencional. En el Capítulo 5 nos encontramos c algunos de estos estudios, como por ejemplo el cálculo de distribución de entrecruzamientos entre cuatro cromáti durante el proceso de entrecruzamiento. Otro estudio que es posible con productos meióticos tomados al azar es la ca tografía de los centrómeros con relación a otros loci. Fin mente, la observación de algunas segregaciones alélicas an males en los análisis de tétradas condujo a uno de los mode moleculares fundamentales del entrecruzamiento, el modelo DNA heterodúplice (o híbrido) que se considerará en detalle el Capítulo 19.

No obstante, ¿poseen hongos y algas cromosomas norma con la conducta típica eucariótica? Generalmente, la respu es sí, de manera que los descubrimientos que se realizan en es sistemas modelos pueden trasladarse con fiabilidad razonab plantas y animales.

En resumen, las tétradas permiten una forma directa de an sis genético de meiosis individuales, así como el estudio de p cesos que son inaccesibles mediante el análisis de produc meióticos tomados al azar. La meiosis es uno de los proce centrales de la biología de los eucariotas. Aunque sabemos m cho sobre ella, queda mucho por aprender. De hecho, es curi que, a pesar de la abundancia de conocimientos moleculares ponibles sobre cómo las células llevan a cabo sus tareas dura los procesos que fueron de los primeros en ser identificados p los genetistas (emparejamiento cromosómico, entrecruzamien y segregación) permanecen entre los procesos celulares m misteriosos.

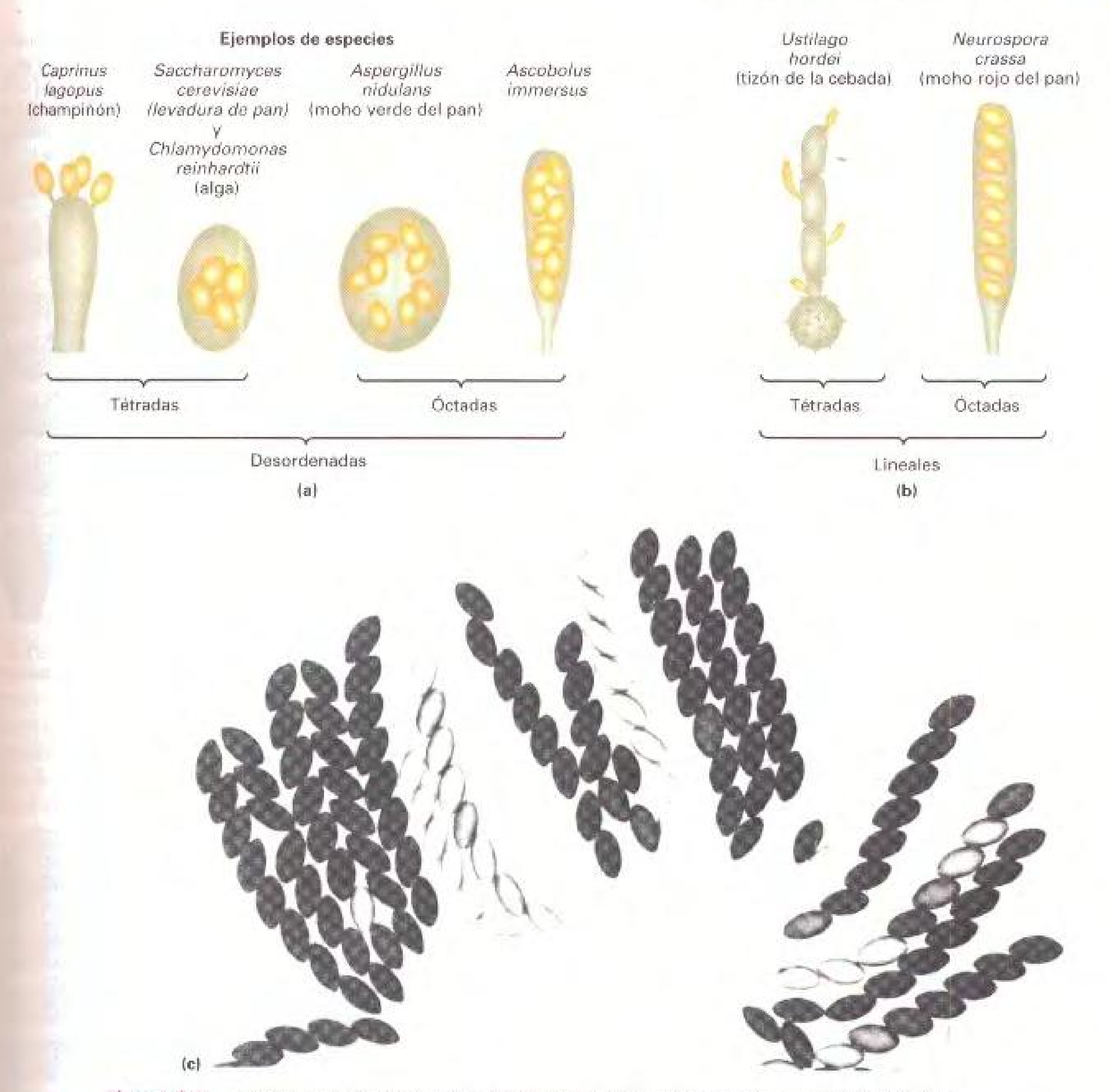


Figura 6-5. Diferentes tipos de tétradas y óctadas observados en varios organismos: (a) desordenadas; (b) lineales; (c) ascas en maduración de *Neurospora crassa*. (Parte C según Namboori B. Raju, *European Journal of Cell Biology*, 1980, 23: 208-223.)

COROLARIO

El análisis de tétradas posibilita el estudio de meiosis individuales, un recurso útil para la investigación de la recombinación y la segregación.

En algunos hongos y algas, los cuatro productos de la meiosis se desarrollan directamente en una tétrada con cuatro esporas sexuales (Fig. 6-5). En ciertos hongos, cada una de las cuatro células producto de la meiosis sufre una división mitótica, dando como resultado un grupo de ocho células denominado **óctada**. No obstante, una óctada no es más que una tétrada compuesta por cuatro pares de esporas. Los miembros de cada par son idénticos, pues se trata de las células hijas resultantes de la división mitótica de uno de los cuatro productos meióticos.

Las esporas sexuales, ya sea en número de cuatro o de ocho, pueden encontrarse en varias disposiciones. En algunas especies, presentan una disposición entremezclada denominada **tétrada desordenada**, que se ilustra en la Figura 6-5*a*. En otras especies, las esporas muestran una distribución asombrosamente lineal que recibe el nombre de **tétrada lineal** (véase Fig. 6-5*b*). En primer lugar, dedicaremos nuestra atención a las tétradas lineales.

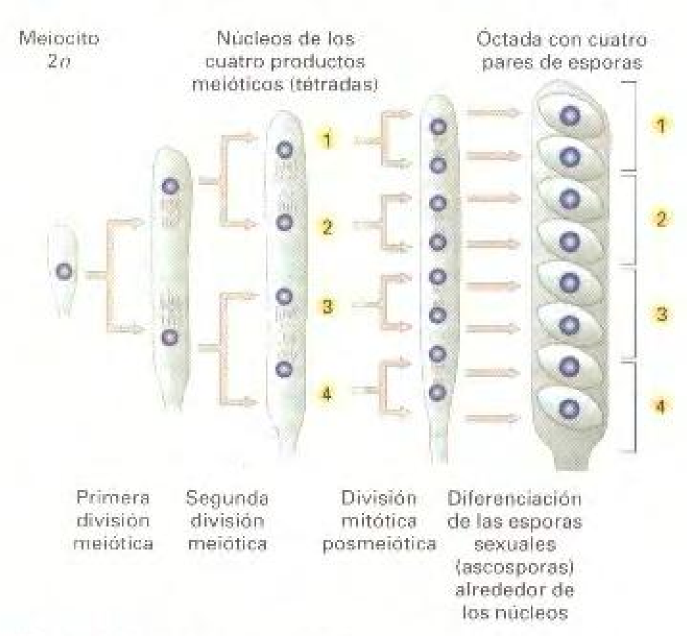


Figura 6-6. Meiosis y mitosis posmeiótica en una tétrada lineal. Las fibras del huso no se solapan en ninguna división, por lo que los núcleos nunca se entremezclan en el asca. Los ocho núcleos resultantes adoptan una disposición lineal que puede seguirse a lo largo de las divisiones.

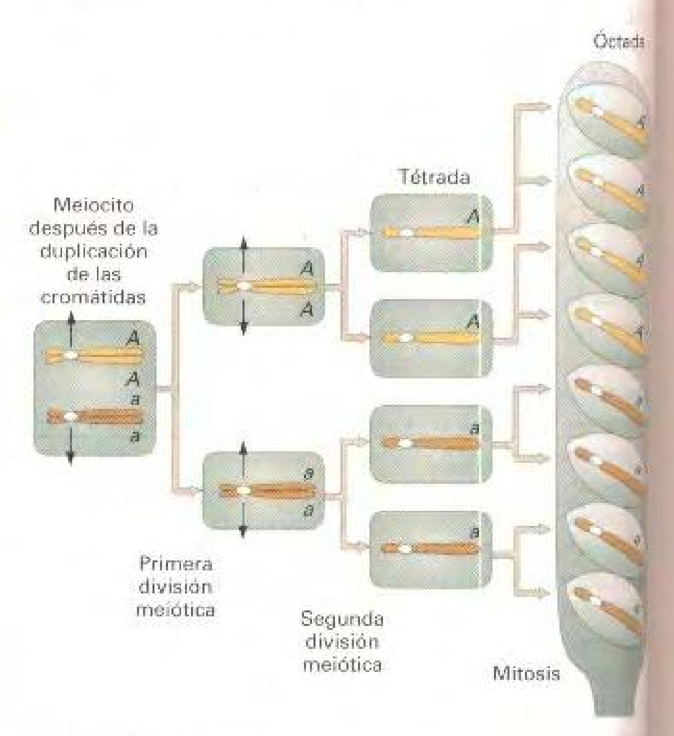


Figura 6-7. Si no hay entrecruzamiento entre el centrómero y el lo
los alelos *A* y *a* de éste segregan a núcleos distintos tras la primera divisió
meiótica. La distribución de ascosporas resultantes se conoce como *patrón de segregación en la primera división.*

Uso de las tétradas lineales para cartografiar los centrómeros

¿Cómo se originan las tétradas lineales? El factor principal es que los husos de la primera y segunda división meiótica y de la mitosis posmeiótica no se solapen. La causa está relacionada probablemente con el hecho de que estas divisiones ocurren en una estructura tubular, que impide el solapamiento de los husos. En cualquier caso, la ausencia de solapamiento significa que los núcleos quedan dispuestos de forma lineal y, por tanto, puede seguirse el linaje de cada uno de los ocho núcleos de la óctada durante la meiosis, tal como se muestra en la Figura 6-6.

Como cabría esperar, y veremos, las tétradas ilustran la segregación independiente de genes durante la meiosis. Las tétradas lineales son también especialmente útiles para un tipo de análisis que no es posible en la mayoría de los organismos: **la localización del centrómero** o estudio de la distancia entre el centrómero y otros genes. El centrómero es una región atractiva del cromosoma, que interactúa con las fibras del huso y asegura el movimiento correcto de los cromosomas durante la división nuclear. Cuando este proceso es defectuoso, las células hijas presentan un número anormal de cromosomas, que puede provocar la muerte o un fenotipo anormal. Por ejemplo, una clase importante de enfermedades genéticas está causada por anomalías en el número de cromosomas (estudiadas en el Cap. 18). Por ello, el centrómero es objeto de una considerable atención en Genética.

¿Cómo se lleva a cabo la localización del centrómero? Usaremos como ejemplo el hongo ascomiceto *Neurospora crassa*. *Neurospora* produce óctadas lineales. En su forma más simple, el método de localización del centrómero considera un solo locus génico y se pregunta por la distancia entre éste y su centró-

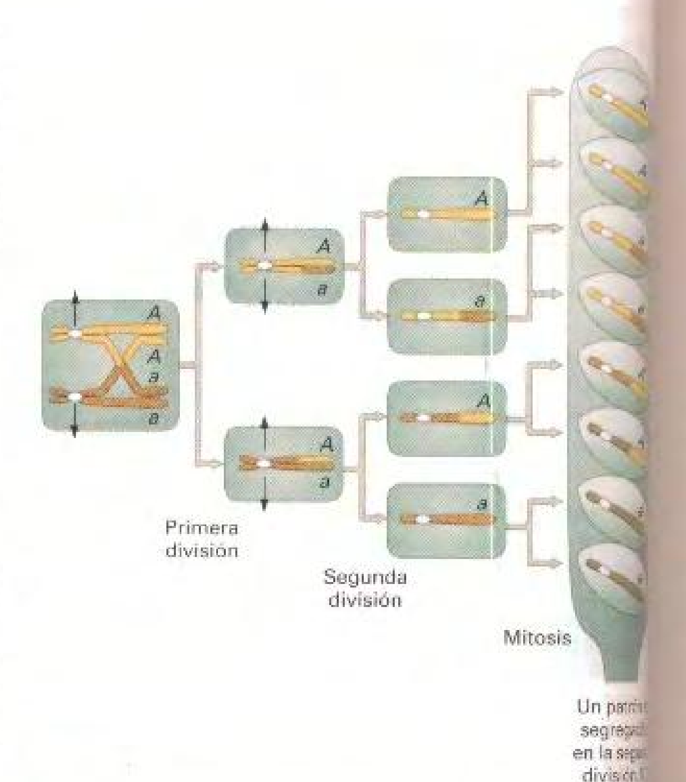


Figura 6-8. Si hay un entrecruzamiento entre el centrómero y el lo
los alelos *A* y *a* de éste no segregan a núcleos distintos hasta la segunda división meiótica.

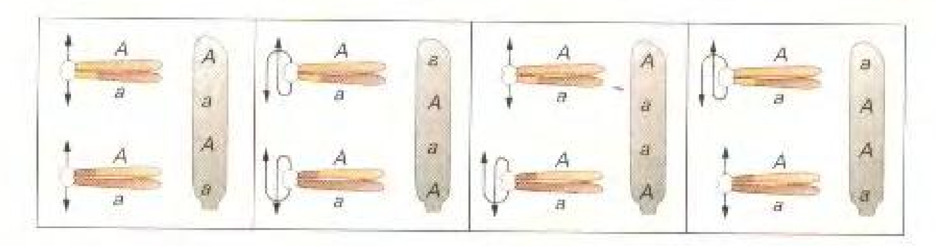


Figura 6-9. Los cuatro tipos de ascas que muestran patrón de segregación en la segunda división aparecen con la misma frecuencia. Ello es debido a que en la segunda división meiótica, los centrómeros se unen al azar a las fibras del huso acromático, respecto a si serán atraídos «hacia arriba» o «hacia abajo».

mero. Se podría elegir cualquier locus de *Neurospora* para ilustrar esta técnica, pero usaremos el **locus implicado en el tipo sexual**, porque fue uno de los primeros que se empleó para localizar el centrómero. Este locus tiene dos alelos, que se representan por *A* y *a*, aunque ninguno de los dos es dominante o recesivo. Estos alelos determinan los tipos sexuales *A* y *a*. Aunque el fenómeno es interesante por sí mismo, aquí usaremos este locus meramente como un marcador genético para ilustrar este análisis.

La localización del centrómero se basa en el hecho de que una meiosis en la que haya ocurrido un entrecruzamiento entre cromátidas no hermanas en la región entre el centrómero y un locus produce una distribución de alelos en la tétrada, u óctada, distinta de la que produce una meiosis en la que no haya ocurrido entrecruzamiento en esa región. Las Figuras 6-7 y 6-8 muestran ejemplos de las dos posibilidades. El patrón más sencillo, que se muestra en la Figura 6-7, aparece cuando no ocurre ningún entrecruzamiento. Este patrón se caracteriza porque todos los productos de un extremo de la tétrada, u óctada, llevan uno de los alelos y todos los productos del otro extremo llevan el otro alelo. En el diagrama puede observarse cómo se origina este patrón de distribución: dado que no hay cruce entre los husos acromáticos, los núcleos portadores del alelo *A* y los portadores del alelo *a* tampoco se cruzan nunca en el asca. Observe también que aunque en el núcleo diploide los alelos *A* y *a* están juntos, la primera división meiótica hace que segreguen limpiamente, y permanecerán ya separados durante la segunda división de la meiosis. Esta separación da origen al término **segregación en la primera división meiótica**, y a que la distribución de alelos en el asca se denomine **patrón de segregación en la primera división** o patrón $\mathbf{M_I}$.

Si se produce un entrecruzamiento entre cromátidas no hermanas en la región situada entre el centrómero y el locus (véase la Fig. 6-8) los alelos *A* y *a* permanecerán todavía juntos en los núcleos al final de la primera división meiótica. Sin embargo, la segunda división meiótica producirá la separación de los alelos *A* y *a* en núcleos distintos, dando origen al término **segregación en la segunda división meiótica**. El patrón de distribución resultante en la tétrada u óctada se denomina **patrón de segregación en la segunda división** o patrón $\mathbf{M_{II}}$. Este patrón corresponde a cualquier distribución en la que ambos alelos aparezcan en cada mitad de la tétrada u óctada.

Ahora, veamos los siguientes resultados experimentales obtenidos de un análisis de óctadas de *Neurospora* e interpretémoslos a la luz de estas ideas. Recuerde que el cruzamiento era *A* × *a*. Los patrones de óctadas que se obtuvieron fueron los siguientes:

Óctadas					
A	*a*	*A*	*a*	*A*	*a*
A	*a*	*A*	*a*	*A*	*a*
A	*a*	*a*	*A*	*a*	*A*
A	*a*	*a*	*A*	*a*	*A*
a	*A*	*A*	*a*	*a*	*A*
a	*A*	*A*	*a*	*a*	*A*
a	*A*	*a*	*A*	*A*	*a*
a	*A*	*a*	*A*	*A*	*a*
126	132	9	11	10	12

Total = 300

Las dos primeras óctadas muestran patrones de segregación M_I, siendo la primera de ellas simplemente una versión invertida de la segunda. Observe que la frecuencia de ambas es más o menos la misma (126 frente a 132). Esta similitud es simplemente debida al hecho de que los centrómeros se unen al azar a las fibras del huso acromático, en cuanto a si el alelo *A* será desplazado «hacia arriba» y el alelo *a* «hacia abajo», o viceversa. Podemos deducir que en 126 + 132 = 258 meiosis, de un total de 300, es decir, en el 86 % de las meiosis, no hubo entrecruzamiento entre el gen que controla el tipo sexual y el centrómero.

Los cuatro tipos de ascas restantes contienen ambos alelos, *A* y *a*, en cada una de sus mitades, por tanto, según la definición anterior, *A* y *a* no segregaron en la primera, sino en la segunda división de la meiosis. ¿Cómo se explican estas cuatro variantes del mismo patrón básico M_{II}? Es consecuencia, de nuevo, de la unión al azar a las fibras del huso, no sólo durante la primera división, sino también durante la segunda división meiótica, como se ilustra en la Figura 6-9. En nuestro ejemplo, los patrones M_{II} suman 42 (9 + 11 + 10 + 12), es decir, el 14 %, indicando

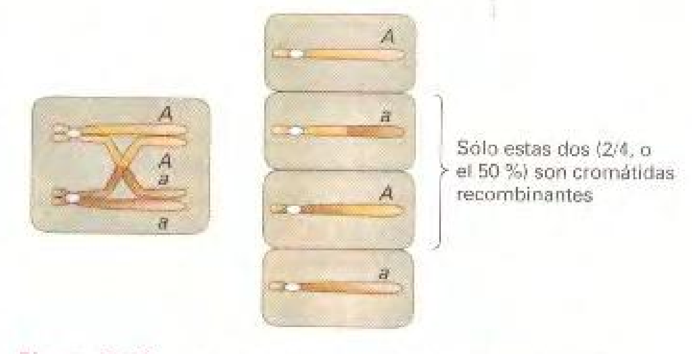


Figura 6-10. Sólo la mitad de las cromátidas de una meiosis con un entrecruzamiento son recombinantes.

que hubo entrecruzamiento entre cromátidas no hermanas, en la región situada entre el locus del tipo sexual y el centrómero, en el 14 % de las meiosis.

Hemos calculado un valor del 14 % para la frecuencia de los patrones M_{II}. ¿Significa este porcentaje que el locus del tipo sexual está separado 14 unidades de mapa del centrómero? La respuesta es no, aunque este valor puede utilizarse para calcular la distancia en términos de unidades de mapa. El valor del 14 % se refiere a un porcentaje de meiosis y ésta no es la forma en la que se definen unidades de mapa. Las unidades de mapa se definen como porcentaje de cromosomas recombinantes resultantes de una meiosis. La Figura 6-10 muestra que cuando ocurre un entrecruzamiento en la región entre el centrómero y un locus, sólo la mitad de los cromosomas resultantes de la meiosis serán recombinantes. Así, para deducir el tamaño de la región en unidades de mapa, es necesario dividir la frecuencia de patrones M_{II} por 2. En nuestro ejemplo, la distancia del locus del tipo sexual a su centrómero será, por tanto, 14 : 2 = 7 unidades de mapa.

COROLARIO

Para determinar la distancia de un locus a su centrómero en unidades de mapa, se calcula el porcentaje de tétradas con una segregación en la segunda división meiótica para ese locus y ese valor se divide por 2.

El análisis anterior puede extenderse a cualquier número de pares de genes heterocigóticos que segreguen en un cruzamiento. Como ejemplo, consideremos las meiosis en un meiocito diploide de *Neurospora* de genotipo $a^+/a \cdot b^+/b$. Supongamos q[ue] desconocemos las relaciones de ligamiento entre los dos loc[i] entre éstos y sus respectivos centrómero o centrómeros. No ob[s]tante, las posibilidades son pocas:

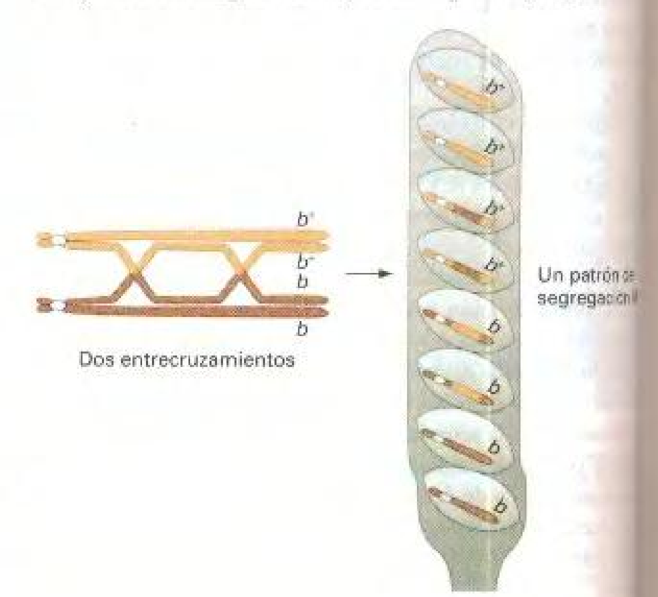
1. Los loci se encuentran en cromosomas diferentes.
2. Los loci están localizados en el mismo cromosoma, pero [en] lados opuestos respecto al centrómero.
3. Los loci están en el mismo lado respecto al centrómero (ob[vi]viamente en el mismo cromosoma).

Las dos primeras posibilidades darán lugar a patrones de segreg[a]ción M_{II} independientes para ambos loci, porque un entrecruz[a]miento en un brazo no produce un patrón M_{II} en el otro. La terc[era] posibilidad es más interesante, en cuanto que un entrecruzamien[to] en la región situada entre el centrómero y el locus más cerca[no] producirá un patrón de segregación M_{II} para ambos loci heteroci[c]góticos (excluyendo los poco frecuentes entrecruzamientos [do]bles). Así, por ejemplo, si *a* estuviera más cerca al centrómero [que] *b*, esperaríamos que la mayoría de las ascas que muestren patro[nes] M_{II} para *a* debieran también monstrarlos para *b* (Fig. 6-1[1]). Sin embargo, algunos patrones M_{II} para el gen *b* serán el resulta[do] de entrecruzamientos en la región entre *a* y *b* y no mostrarán coin[ci]dencia de patrón M_{II} para el gen *a*. Esta coincidencia en los pa[tro]nes M_{II} constituye una prueba del ligamiento entre ambos loci.

COROLARIO

La coincidencia en los patrones de segregación en la segunda división meiótica puede indicar la localización y el orden de los genes en el mismo brazo del cromosoma.

Cuanto más lejos se encuentre un locus del centrómero, ma[yor] será la frecuencia de M_{II}. Pero dicha frecuencia nunca alca[n]za el 100 %, de hecho, su máximo teórico es el 67 %, es decir[.] El motivo de este límite es que los entrecruzamientos múltiple[s] (sobre todo los dobles) adquieren más y más relevancia confor[]me el intervalo se hace más grande, y los entrecruzamientos do[]bles generan tanto patrones M_I como M_{II}. Por ejemplo:



Patrones M_{II} coincidentes en una sola asca

Figura 6-11. Cuando dos loci se encuentran en el mismo brazo cromosómico, un entrecruzamiento entre el centrómero y el locus más próximo produce el mismo patrón M_{II} para *ambos* loci.



Figura 6-12. Cuando un locus está muy alejado de su centrómero, el elevado número de entrecruzamientos desliga al locus del centrómero.

Una manera intuitiva de calcular el valor máximo de la frecuencia del patrón M_{II} es mediante el siguiente «experimento simulado». Considere un locus, b^+/b, tan alejado del centrómero que se producen numerosos entrecruzamientos entre ambos (Fig. 6-12). Estos múltiples entrecruzamientos desligan en la práctica al locus de su centrómero, pudiendo terminar colocándose los dos alelos b^+ y los dos alelos b en las ascas de cualquiera de las maneras posibles. Esta situación puede simularse considerando cuántas formas distintas hay de dejar caer cuatro bolas (dos b^+ y dos b) en un tubo de ensayo (véase la Fig. 6-13 para seguir esta simulación). La primera bola puede ser b^+ o b; eso da lo mismo. Supongamos que es b^+. Nos quedan, por tanto, dos bolas b y una b^+. La siguiente bola en caer determina que el patrón sea M_I o M_{II}. Si las bolas se dejan caer al azar en el tubo, una y otra vez, un tercio de las veces la segunda bola será b^+; la tercera y cuarta bola serán entonces de tipo b, generándose así un patrón M_I. Los otros dos tercios de las veces, la segunda bola será b, generándose entonces un patrón M_{II}. Vemos, por tanto, que incluso con tan alto número de entrecruzamientos, el patrón M_{II} no puede alcanzar una frecuencia mayor de $\frac{2}{3}$.

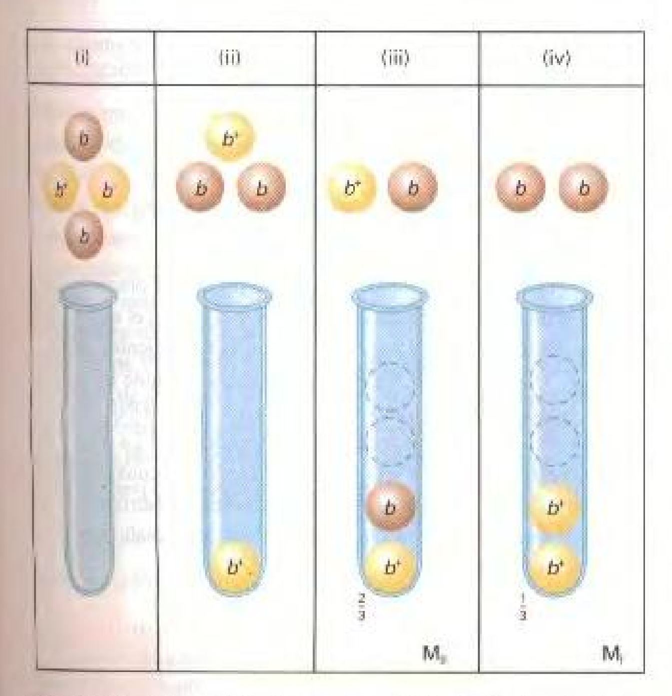


Figura 6-13. Demostración de que, en un análisis de tétradas ordenadas, las frecuencias de los patrones M_I y M_{II} tienen como valores límites $\frac{1}{3}$ y $\frac{2}{3}$, respectivamente. (Para más detalle, consultar el texto.)

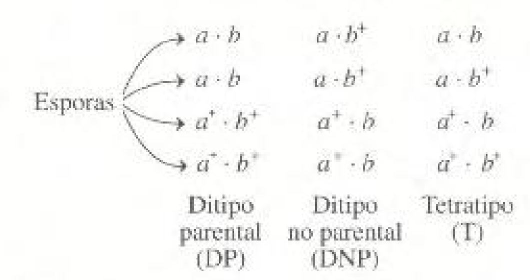
COROLARIO

La frecuencia máxima posible de los patrones de segregación en la segunda división es 66.7 %.

Este máximo de 66.7 % plantea un enigma. Intuitivamente, parece que esta frecuencia máxima de M_{II} debería ser directamente equivalente al valor máximo para RF del 50 %, pero 66.7 : 2 = = 33.3 %, que equivaldría a 33.3 unidades de mapa (m.u.). El responsable, una vez más, es la existencia de entrecruzamientos múltiples. Podríamos deducir una función de mapa para los patrones M_{II}, pero en la práctica en más sencillo acogerse al análisis de intervalos pequeños y reconocer que cuando aumentan las frecuencias M_{II} las estimaciones sobre el tamaño del intervalo que separa el locus y su centrómero son cada vez más inexactas.

Utilización del análisis de tétradas para corregir el efecto de los entrecruzamientos dobles en el cálculo de la distancia de mapa

Pueden usarse tanto tétradas y óctadas lineales o desordenadas para determinar las posiciones de los genes en relación con otros genes. Para hacer eso, las tétradas tienen que ser clasificadas en **ditipo parental (DP), ditipo no parental (DNP)** y **tetratipo (T)**. En un cruzamiento de $a^+ \cdot b^+ \times a \cdot b$, estos tipos son:



Fíjese que estos genotipos no están ordenados en un orden particular, a diferencia de lo que vimos en la situación concreta de las tétradas lineales; por tanto, aunque el primer tipo (DP) podría parecer un caso de segregación M_I, éste no es el caso: las esporas podrían igualmente haberse escrito en otro orden. Las ascas se han clasificado meramente por el hecho de contener dos genotipos (*di*tipo) o cuatro genotipos (*tetra*tipo, representados por T). Dentro de la clase ditipo, los dos genotipos pueden ser parentales (DP) o no parentales (DNP). Trate de escribir algunas ascas para convencerse a sí mismo de que no son posibles otros tipos aparte de DP, DNP y T.

Ahora bien, ¿qué nos dicen estos tipos sobre el ligamiento? Advertirá al examinarlos que sólo los tipos DNP y T contienen recombinantes, así que éstas son las clases importantes para establecer la frecuencia de recombinación. Las esporas de la clase DNP son todas recombinantes, mientras que sólo la mitad de las esporas de la clase T lo son. Por tanto, podemos establecer una fórmula para determinar la RF mediante análisis de tétradas, siendo T y DNP los porcentajes de cada clase:

$$RF = \tfrac{1}{2}\,T + DNP$$

Si al aplicar esta fórmula se obtiene un valor de frecuencia de recombinación del 50 %, entonces sabemos que los loci no de-

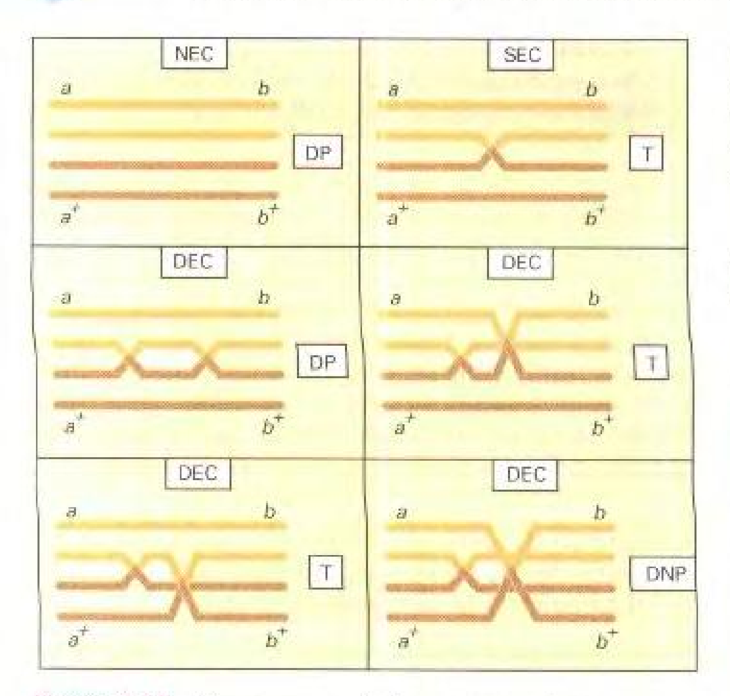


Figura 6-14. Tipos de ascas producidos por entrecruzamientos entre dos loci ligados. NEC, meiosis sin entrecruzamiento; SEC, meiosis con un solo entrecruzamiento; DEC, meiosis con entrecruzamientos dobles.

ben estar ligados, y de igual forma, si la RF es menor del 50 %, los genes deben estar ligados y podríamos utilizar ese valor de RF para representar el número de unidades de mapa que los separa. No obstante, igual que con otros análisis de ligamiento estudiados con anterioridad en este capítulo, ello supondría subestimar la distancia de mapa, pues no tiene en cuenta los entrecruzamientos dobles o de mayor orden. Sin embargo, las frecuencias de DP, DNP y T pueden usarse para corregir el efecto de los entrecruzamientos dobles. Primero, necesitamos entender cómo se producen las clases DP, DNP y T en cruzamientos en los que los marcadores están ligados. Supongamos que los genes a y b están ligados. Si asumimos que en cada meiosis, y en la región entre a y b, puede no producirse entrecruzamiento (NEC), producirse uno solo (SEC) o producirse dos (DEC), entonces podemos representar las clases de ascas desordenadas que se originan de tales meiosis como se indica en la Figura 6-14. Pueden ocurrir entrecruzamientos triples o de mayor orden, pero suponemos que serán poco frecuentes y su efecto, por tanto, insignificante. Observe que la Figura 6-14 es una mera ampliación de la Figura 6-3.

La clave para este tipo de análisis es la clase DNP, que para loci ligados, únicamente puede originarse por un entrecruzamiento doble que implique a las cuatro cromátidas. Puesto que suponemos que los entrecruzamientos dobles entre las cromátidas se producen aleatoriamente, podemos también asumir que las frecuencias de las cuatro clases DEC serán iguales. Esta Suposición significa que la clase DNP deberá ser exactamente $\frac{1}{4}$ de la clase DEC, y, por tanto, puede estimarse que:

$$\text{DEC} = 4\text{DNP}$$

La clase constituida por meiosis con un solo entrecruzamiento se puede calcular también mediante una relación similar. Observe que las ascas tetratipo (T) pueden ser el resultado de meiosis con uno o con dos entrecruzamientos. No obstante, podemos estimar que el componente de clase T procedente de meiosis DEC es 2DNP. De aquí se deduce que la clase SEC se puede expresar como:

$$\text{SEC} = \text{T} - 2\text{DNP}$$

Una vez estimados los tamaños de las clases SEC y DEC, la clase de meiosis sin entrecruzamientos se puede calcular como:

$$\text{NEC} = 1 - (\text{SEC} + \text{DEC})$$

De este modo, hemos calculado el tamaño de las clases NEC, SEC y DEC en la región señalada. Podemos emplear estas relaciones para obtener una estimación directa de m, el número medio de entrecruzamientos por meiosis en esta región. El valor de m se calcula simplemente sumando la clase SEC y la clase DEC *multiplicada por dos* (debido a que esta clase está constituida por entrecruzamientos dobles). De aquí:

$$m = (\text{T} - 2\text{DNP}) + 2(4\text{DNP}) = \\ = \text{T} + 6\text{DNP}$$

En el apartado dedicado a la función de mapa, aprendimos que para transformar un valor de m en unidades de mapa, hay que multiplicarlo por 50 porque cada entrecruzamiento produce un 50 % de recombinantes como media. Entonces:

$$\text{Distancia de mapa (m.u.)} = 50(\text{T} + 6\text{DNP})$$

Supongamos que en nuestro cruzamiento hipotético de $a^+ b^+ \times a\ b$, las frecuencias que se observan de las distintas clases de ascas son: 56 % de DP, 41 % de T y 3 % de DNP. De acuerdo con la fórmula, la distancia entre los loci a y b es:

$$50[0.41 + (6 \times 0.03)] = 50(0.59) \\ = 29.5 \text{ m.u.}$$

Comparemos este valor con el obtenido directamente de la RF. Recuerde que la fórmula es:

$$\text{RF} = \tfrac{1}{2}\text{T} + \text{DNP}$$

En nuestro caso,

$$\text{RF} = 0.205 + 0.03 \\ = 0.235 \text{ o } 23.5 \text{ m.u.}$$

Este valor de RF es 6 m.u. más pequeño que el obtenido con la fórmula de la distancia de mapa, debido a que en el análisis de la RF no corregimos el efecto de los entrecruzamientos dobles.

¿Qué valores de DP, DNP y T se esperan cuando los genes no están ligados? El tamaño de las clases DP y DNP será igual como resultado de la segregación independiente. La clase T puede producirse sólo por un entrecruzamiento en cualquiera de las regiones entre cada gen y su correspondiente centrómero; y, por tanto, el tamaño de esta clase dependerá del tamaño total de estas dos regiones.

COROLARIO

El análisis de tétradas lineales o desordenadas puede emplearse para calcular las frecuencias de entrecruzamientos sencillos y dobles, que permiten determinar distancias de mapa precisas.

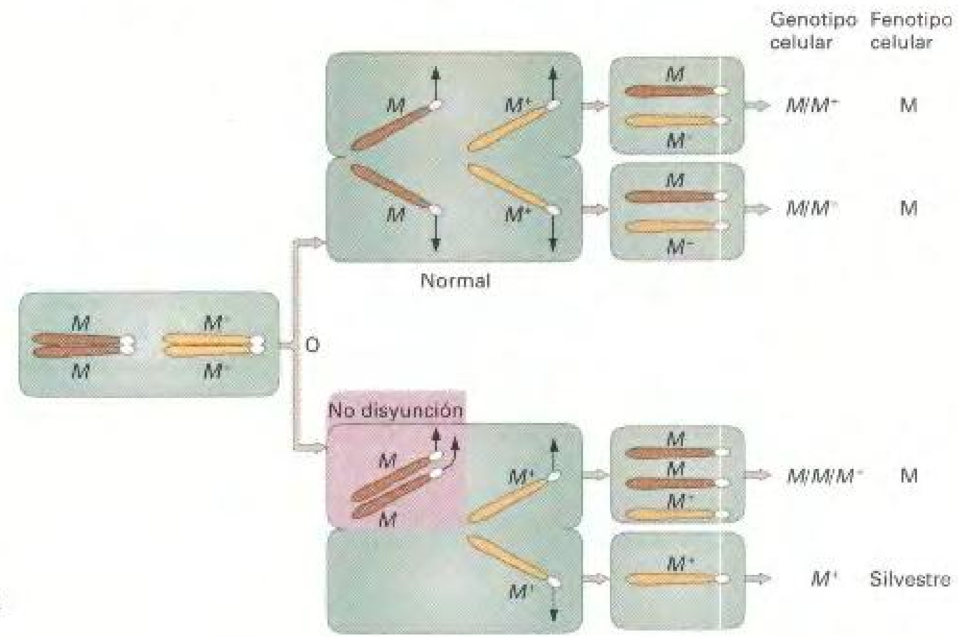


Figura 6-15. La falta de disyunción mitótica puede provocar una segregación de fenotipos.

Cartografía de genes mediante segregación y recombinación mitóticas

Normalmente, los fenómenos de segregación y recombinación se consideran relacionados con la meiosis, pero también ocurren durante la mitosis, aunque con menor frecuencia. La existencia de segregación y recombinación mitóticas puede demostrarse fácilmente cuando se elige el sistema genético apropiado.

Segregación mitótica

Normalmente, el término *segregación* se utiliza para describir la separación de los dos alelos de un heterocigoto en dos individuos o células diferentes. Hemos visto varias veces el fenómeno de la segregación cuando tratamos el análisis de la meiosis basado en la primera Ley de Mendel. Sin embargo, a veces se observa segregación de los alelos cuando la célula heterocigótica sufre división mitótica. El ejemplo siguiente aclara la naturaleza de la segregación mitótica.

En los años 30, Calvin Bridges estaba observando hembras de *Drosophila* de genotipo M^+/M (M es un alelo dominante que produce un fenotipo de cerdas finas). Sorprendentemente, algunas hembras mostraban una mancha, o **sector**, de cerdas normales, en un cuerpo predominantemente de fenotipo M. Así pues, los alelos del heterocigoto estaban generando una segregación fenotípica. Bridges concluyó que esta segregación era resultado de una **no disyunción mitótica**, un fallo en la separación de los cromosomas del tipo que se representa en la Figura 6-15. Por un efecto similar, heterocigotos para alelos recesivos autosómicos y sus correspondientes alelos silvestres (del tipo a^+/a) producen sectores de fenotipo recesivo en un fondo fenotípicamente silvestre. Dichos sectores se achacan también a falta de disyunción mitótica.

Otros casos de segregación en el tejido somático de un heterocigoto se deben a la **pérdida de cromosomas durante la mitosis**. En esta ocasión, el cromosoma portador del alelo dominante de algún modo se excluye cuando se reconstituye el núcleo de la célula hija después de la división mitótica (Fig. 6-16).

En relación con estos dos fenómenos hay otros dos términos que resultan útiles para los genetistas. En primer lugar, la **variegación**, que es la mera existencia de sectores de tejido somático con aspecto diferente, cualquiera que sea la causa que los origine. En segundo lugar, el término **mosaico**, que se refiere a aquel individuo constituido por tejidos con dos o más genotipos distintos, que suelen reconocerse por presentar fenotipos diferentes. La frase siguiente es un ejemplo de su uso: las hembras M^+/M estudiadas por Bridges eran variegadas, ya que la falta de disyunción mitótica había producido mosaicos que contenían sectores con dos genotipos distintos.

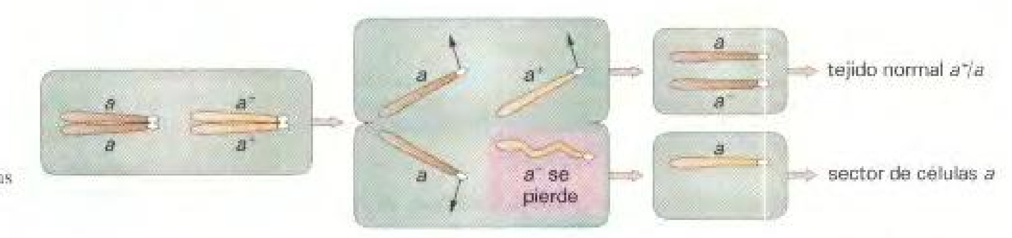


Figura 6-16. La pérdida de cromosomas durante la división mitótica puede provocar segregación de fenotipos.

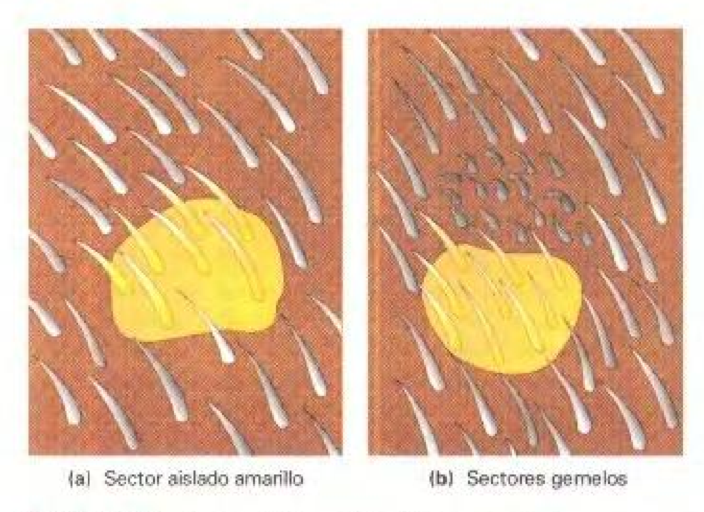


Figura 6-17. Sectores de la superficie del cuerpo con fenotipos inesperados, en moscas de *Drosophila* de genotipo $y^+ sn/y\ sn^+$, donde *sn* determina cerdas cortas y rizadas e *y* determina cuerpo amarillo.

Entrecruzamientos mitóticos

En 1936, Curt Stern observó el primer caso de segregación mitótica debida a **entrecruzamiento mitótico**. Trabajando con dos genes de *Drosophila* ligados al cromosoma X, *y* (que determina cuerpo amarillo) y *sn* (del inglés *singed*, pues determina cerdas cortas y rizadas), Stern realizó el cruzamiento:

$$y^+ sn/y^+ sn \times y\ sn^+/Y$$

Las hembras descendientes eran de aspecto silvestre, como se esperaba de sus genotipos $y^- sn/y\ sn^+$. Sin embargo, algunas hembras mostraban sectores de tejido amarillo o de tejido con cerdas cortas y rizadas, los cuales podrían explicarse por no disyunción mitótica o pérdida de cromosomas. Otras hembras mostraban **sectores gemelos**. En este caso, un sector gemelo estaba constituido por dos sectores contiguos —uno de tejido amarillo y otro con cerdas cortas y rizadas— en un fondo de tejido silvestre (Fig. 6-17). Stern se dio cuenta de que los sectores gemelos eran demasiado frecuentes para deberse a la yuxtaposición al azar de dos sectores sencillos. Por esta razón y porque las dos manchas del sector gemelo eran siempre contiguas, supuso que los sectores gemelos eran los productos recíprocos del mismo suceso. Pensó que tal suceso debió iniciarse cuando, por azar, los dos cromosomas homólogos vinieran a caer emparejados uno a lo largo del otro y las cromátidas de cada cromosoma homólogo distinto sufrieran un entrecruzamiento entre el locus *sn* y el centrómero. Un diagrama de este entrecruzamiento aparece en la Figura 6-18. El diagrama también muestra que un entrecruzamiento mitótico entre los loci *y* y *sn* producirá una mancha amarilla aislada. Así, tanto las manchas gemelas como las amarillas aisladas se pueden explicar mediante una hipótesis común de entrecruzamiento mitótico. Observe que todos los genes en heterocigosis distales al entrecruzamiento con respecto al centrómero han quedado en homocigosis, lo que es una característica general del entrecruzamiento mitótico.

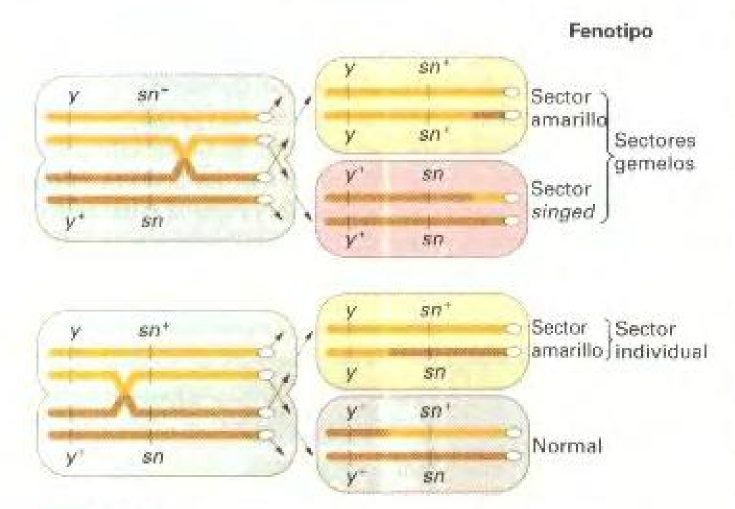


Figura 6-18. Un entrecruzamiento mitótico puede provocar una segregación fenotípica como la mostrada en la Figura 6-17.

Manchas gemelas se han observado en células de otros organismos diploides, incluyendo las plantas. El entrecruzamiento mitótico parece ocurrir con regularidad (aunque con escasa frecuencia) en todos los eucariotas.

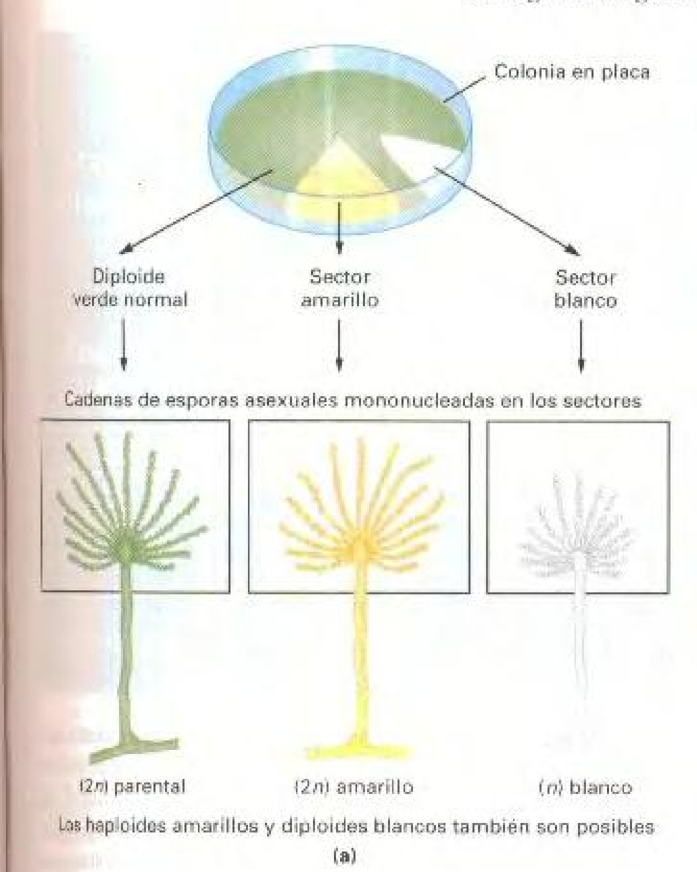
La definición de recombinación mitótica es similar a la de recombinación meiótica: **recombinación mitótica** es cualquier proceso mitótico que genera una célula diploide con una combinación de alelos distinta de la presente en la célula diploide parental. Compare esta definición con la de recombinación meiótica de la página 144.

Recombinación mitótica en hongos

Algunos hongos constituyen sistemas apropiados para el estudio del entrecruzamiento mitótico y la segregación de cromosomas. Sin embargo, para poder observar estos fenómenos mitóticos en hongos, primero hay que generar células de hongo diploides, puesto que las células haploides no dan oportunidad a que recombinen dos genomas. Los diploides se forman espontáneamente en muchos hongos. El hongo que examinaremos es *Aspergillus nidulans*, un moho verde. *Aspergillus* es muy adecuado para el análisis mitótico. Las hifas aéreas de este hongo producen largas cadenas de **conidios** (esporas asexuales). Cada conidio contiene un solo núcleo y el fenotipo de cualquier espora individual depende solamente del genotipo de su propio núcleo, lo que permite la utilización de ciertos métodos de selección. Si se mezclan dos estirpes haploides, las hifas se fusionan y ambos tipos de núcleos se encuentran entonces en un mismo citoplasma. Estas estirpes se denominan **heterocariontes**. Genéticamente, los heterocariontes no son diploides y su constitución cromosómica puede expresarse más apropiadamente como $n + n$. Los heterocariontes, como las otras estirpes, producen conidios mononucleados.

Considere un heterocarionte con los genotipos nucleares siguientes:

Componente nuclear I	*w*	*ad*$^+$	*pro*	*paba*$^+$	*y*$^+$	*bi*
Componente nuclear II	*w*$^+$	*ad*	*pro*$^+$	*paba*	*y*	*bi*$^+$



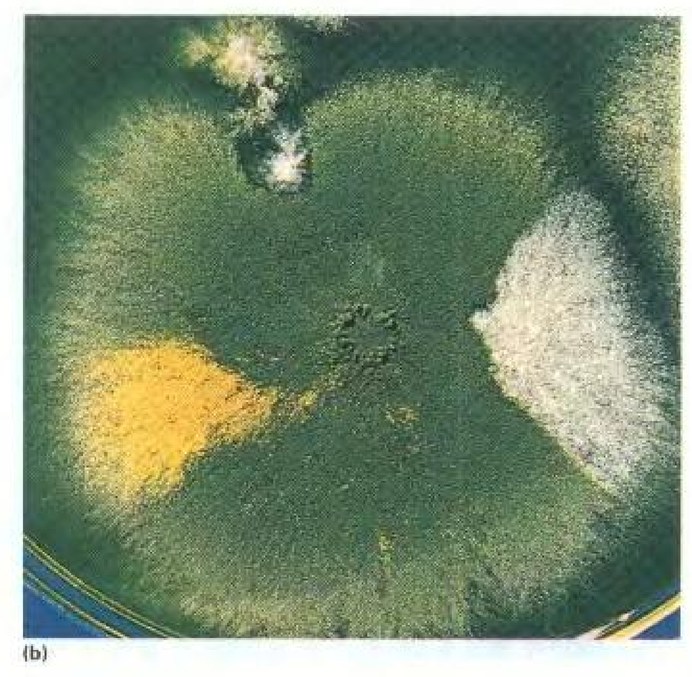


Figura 6-19. (a) Sectores que indican que ha habido segregación en un diploide de *Aspergillus* de genotipo w^+/w · y^+/y, donde *w* e *y* determinan que los conidios sean blancos y amarillos, respectivamente. Los conidios haploides son de menor tamaño. (b) Fotografía de un sector blanco y otro amarillo en una colonia diploide. (Parte b, cortesía de Etta Käfer.)

Los símbolos correspondientes a los alelos significan: *ad* = requerimiento de adenina; *pro* = requerimiento de prolina; *paba* = requerimiento de ácido *para*aminobenzoico; *bi* = requerimiento de biotina; *w* = conidios blancos; *y* = conidios amarillos.

Los alelos *ad*, *pro*, *paba* y *bi* son todos recesivos frente a los correspondientes alelos silvestres. Como el heterocarionte posee un alelo silvestre de cada gen, no requiere suplemento alguno para crecer. Como cada conidio que produce el heterocarionte es mononucleado, presenta el fenotipo amarillo o blanco. Por tanto, las colonias del heterocarionte son de un tono blanco amarillento que da un aspecto como de «sal y pimienta».

En algunos heterocariontes aparecen sectores verdes. Verde es el color normal del hongo silvestre y revela en este caso la aparición de un núcleo diploide, formado espontáneamente y propagado hasta formar un sector verde. La *complementación* (pág. 107) de los alelos dominantes y^+ y w^+ en el mismo núcleo hace aparecer el color silvestre. Se pueden tomar conidios diploides del sector verde y cultivarlos. Como el heterocarionte, las células diploides no requieren suplementos nutritivos para crecer, ya que contienen los alelos silvestres. Cuando el cultivo está bien crecido, pueden observarse algunos sectores raros que producen conidios blancos o amarillos. Algunos de estos sectores son diploides (reconocibles por el diámetro grande de sus conidios) y otros son haploides (con conidios de pequeño diámetro). Dos tipos de sectores resultan adecuados para ilustrar el entrecruzamiento mitótico y la segregación de cromosomas: los sectores haploides blancos y los sectores diploides amarillos (Fig. 6-19).

Sectores haploides blancos. Si se aíslan sectores blancos y se analizan, casi exactamente la mitad de ellos son de genotipo *w* ; ad^+ *pro* $paba^+$ y^+ *bi*, y la otra mitad de genotipo *w* ; *ad* pro^+ *paba* *y* bi^+. Por tanto, el núcleo diploide original se ha convertido de alguna forma en haploide, un proceso conocido como **haploidización**, posiblemente por pérdidas sucesivas de un elemento de cada par cromosómico. Al estudiar sólo conidios haploides blancos, seleccionamos automáticamente el cromosoma portador del alelo *w*. La mitad de los sectores que expresan *w* han retenido el cromosoma ad^+ *pro* $paba^+$ y^+ *bi*; la otra mitad ha retenido el cromosoma *ad* pro^+ *paba* *y* bi^+ (Fig. 6-20) Así, los alelos recesivos para el color pueden emplearse para obtener datos de liga-

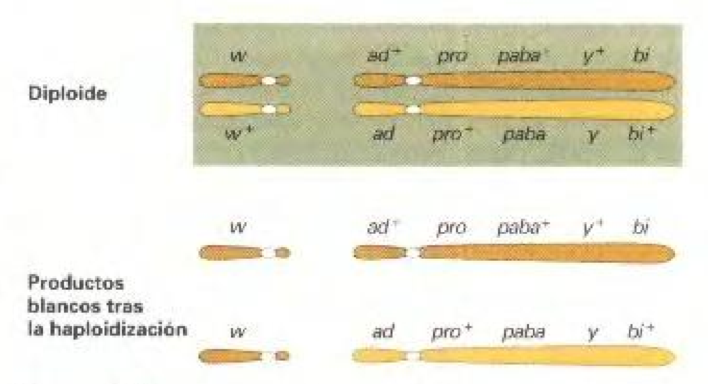


Figura 6-20. Genotipo de un diploide de *Aspergillus* y de dos productos blancos originados por haploidización.

Figura 6-21. Un entrecruzamiento mitótico puede producir un sector diploide amarillo en el diploide de *Aspergillus* mostrado. Observe que el entrecruzamiento provoca la homocigosis de todos los loci heterocigóticos situados entre el entrecruzamiento y el extremo del cromosoma.

miento, pues la haploidización produce un resultado similar a la segregación independiente. El procedimiento general es seleccionar primero el cromosoma que lleva el marcador de color y luego determinar qué genes se mantienen con él, y cuáles son independientes de él y cómo se agrupan. En nuestro ejemplo, este procedimiento lleva a localizar a *ad, pro, paba, y*, y *bi* en un cromosoma y *w* en otro.

COROLARIO

La haploidización produce un efecto semejante a la segregación independiente y puede utilizarse para deducir qué genes están ligados y cuáles segregan independientemente.

Sectores amarillos diploides. Cuando se examinan sectores amarillos diploides, normalmente resultan ser portadores de cromosomas recombinantes. Por ejemplo, un tipo de sector era amarillo y requería ácido *para*aminobenzoico (PABA) para crecer. Recuerde que un entrecruzamiento mitótico puede convertir loci heterocigóticos en homocigóticos, así que este tipo de sector puede explicarse por un entrecruzamiento mitótico (Fig. 6-21). Dese cuenta que en el análisis mitótico debemos seguir dos fibras del huso a cada polo de la célula. Este diploide amarillo que requiere PABA se generó por un intercambio mitótico que tuvo lugar en la región situada entre el centrómero y *paba*; otros diploides amarillos se generarán por intercambios mitóticos entre *paba* e *y*, pero estos diploides no requerirán PABA para crecer. Las frecuencias relativas de estos dos tipos permite establecer una especie de mapa de ligamiento mitótico de esa región. Esta forma de cartografía se lleva a cabo en varios hongos. Como era de esperar, la ordenación de los genes en los mapas mitóticos coincide con la de los mapas meióticos; pero, inesperadamente, la longitud relativa de muchos intervalos resulta ser distinta al comparar los mapas mitóticos y meióticos. El motivo de esta diferencia es desconocido. Observe que cada gen en heterocigosis situado entre el sitio del entrecruzamiento y el extremo del brazo cromosómico se hace homocigótico al producirse el entrecruzamiento mitótico, lo que suministra por sí mismo información cartográfica útil. Como los experimentos de recombinación mitótica se realizan con cultivos vegetativos del hongo, en rápido crecimiento, los resultados se obtienen mucho antes que en el análisis meiótico, que requiere la fase sexual, más lenta.

COROLARIO

Un entrecruzamiento mitótico hace homocigóticos a todos los genes heterocigóticos localizados distalmente con respecto al sitio de entrecruzamiento, y este principio puede utilizarse para deducir el orden de los genes. Las frecuencias de las distintas clases de homocigotos son una medida de la distancia de mapa relativa.

En esta sección, nos hemos encontrado con varios procesos distintos que hacen que un par alélico heterocigótico segregue durante la mitosis, produciendo un mosaico con genotipos distintos. En capítulos posteriores encontraremos otros procesos que también producen esta variegación, pero el corolario siguiente resume las fuentes de variegación que hemos estudiado en este capítulo.

COROLARIO

La no disyunción, pérdida de cromosomas, entrecruzamiento y haploidización que ocurren durante la mitosis provocan que un par de alelos heterocigóticos segreguen, generando un mosaico con tejidos que expresan los fenotipos de cada alelo.

Cartografía mediante hibridación *in situ*

Si se dispone de un gen clonado, el clon puede usarse para determinar la localización del gen en el cromosoma mediante una técnica especial de cartografía. A partir del clon puede fabricarse una sonda marcada que se usa en la **hibridación *in situ*** de cromosomas. En esta técnica se incuba una preparación cromosómica en la que el DNA ha sido parcialmente desnaturalizado, dejando las cadenas ligeramente separadas, con una solución de la sonda. La difusión aleatoria de la sonda permite que se establezcan puentes de hidrógeno complementarios entre la sonda y el gen en su posición cromosómica original. La marca de la sonda revela el locus que hibrida y, por tanto, su posición en el cromosoma.

Las sondas que se usan están generalmente marcadas con radiactividad o fluorescencia. En la técnica de **hibridación *in situ* fluorescente** (**FISH**, del inglés *fluorescence in situ hybridization*), el clon se marca con un molécula fluorescente y se incuba con una preparación cromosómica parcialmente desnaturalizada. La sonda se une al cromosoma *in situ*, de modo que la localización en el cromosoma del fragmento de DNA clonado se reconoce por una mancha brillante de fluorescencia (Fig. 6-22).



Figura 6-22. Análisis mediante hibridación *in situ* fluorescente de los cromosomas de tres especies de coníferas. Las sondas que se utilizaron fueron clones de rDNA 5S (azul), la región codificante de los rDNA 18S, 5.8S y 26S (rosa), y en los abetos blanco y Sitka, un tipo de DNA satélite denominado SGR-31 (verde). En este caso, el análisis FISH se realizó para localizar los loci informativos, usarlos como marcadores para identificar cromosomas específicos y hacer comparaciones evolutivas entre especies. (Fotografía cortesía de Garth Brown, Vindhya Amarasinghe y John Carlson.)

Cartografía de genes humanos mediante la utilización de híbridos de células somáticas hombre-ratón

En el Capítulo 5 estudiamos que es difícil cartografiar genes humanos mediante técnicas basadas en la recombinación. La hibridación de células hombre-ratón evita este problema. Esta técnica puede emplearse para asignar genes a cromosomas específicos, así como determinar su posición en los mismos.

Asignación de genes a cromosomas

La técnica de hibridación de células somáticas se utiliza extensamente en la cartografía del genoma humano, pero puede usarse, en principio, en muchos sistemas animales distintos. La técnica emplea células que están creciendo en cultivo. El *virus Sendai* posee una propiedad útil que hace posible esta técnica cartográfica. Cada virus Sendai tiene varios puntos de unión, de manera que puede adherirse simultáneamente a dos células distintas si

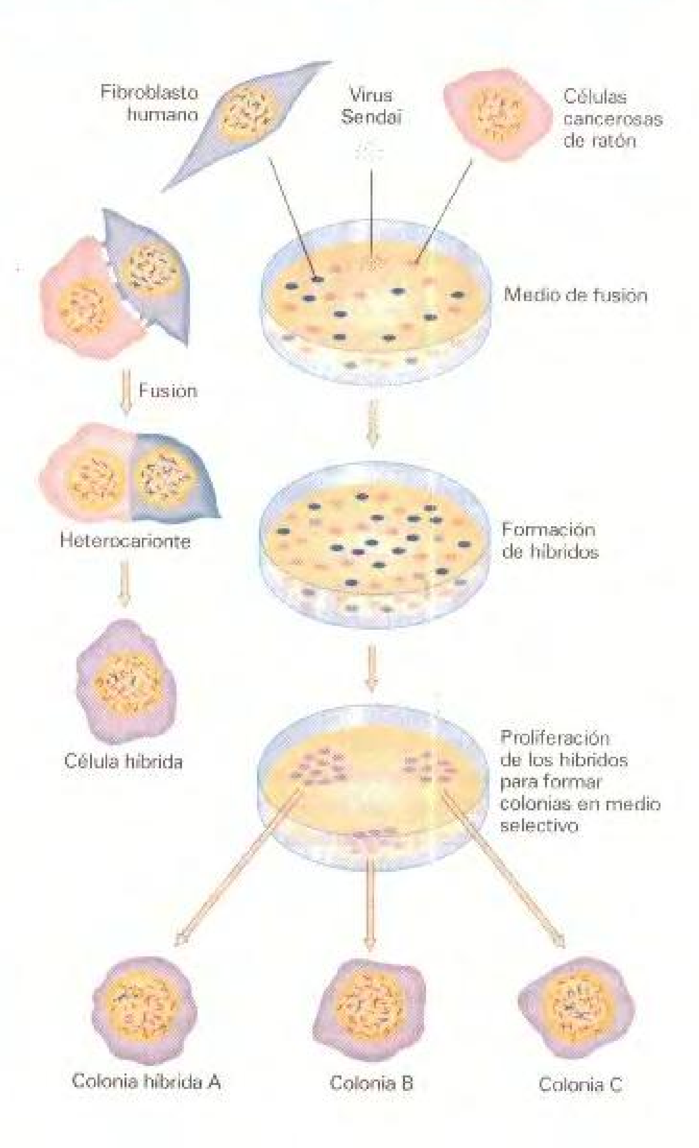
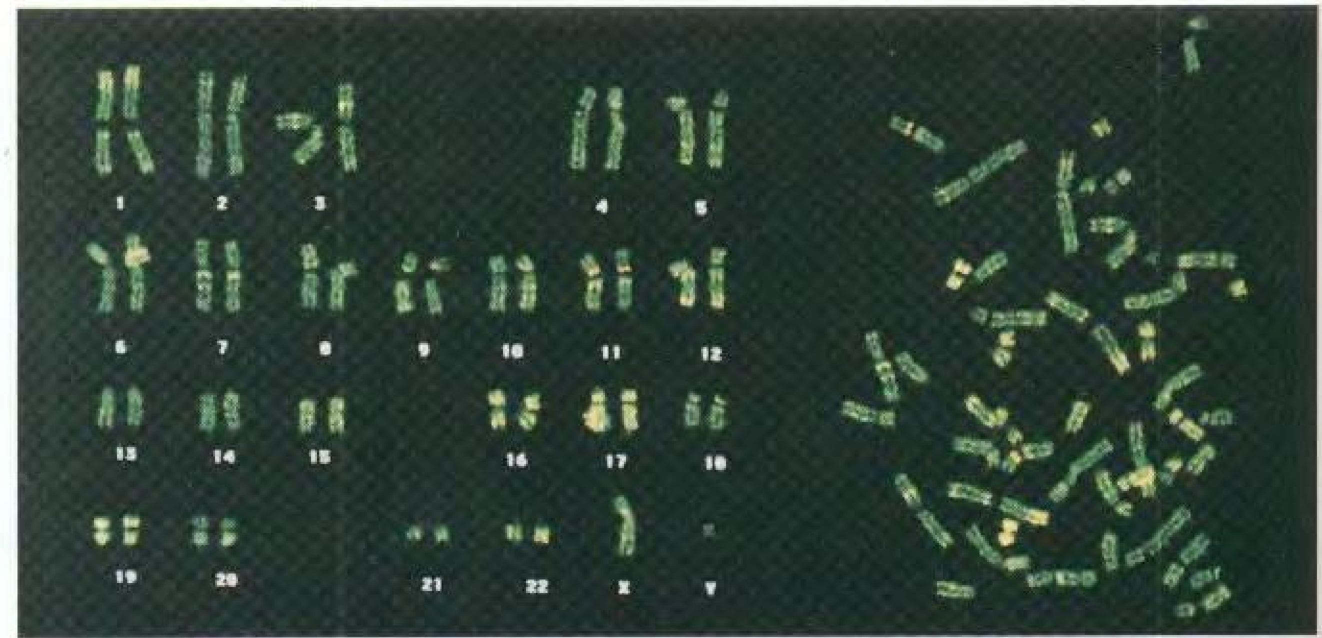


Figura 6-23. Las técnicas de fusión celular aplicadas a las células de ratón y humanas producen colonias, cada una de las cuales contiene el genoma completo de ratón y unos cuantos cromosomas humanos (coloreados). Un fibroblasto es una célula de tejido conjuntivo fibroso. (De F. H. Ruddle y R. S. Kucherlapati, *Hybrid cells and Human Genes*. Copyright © 1974 by Scientific American inc. Reservados todos los derechos.)



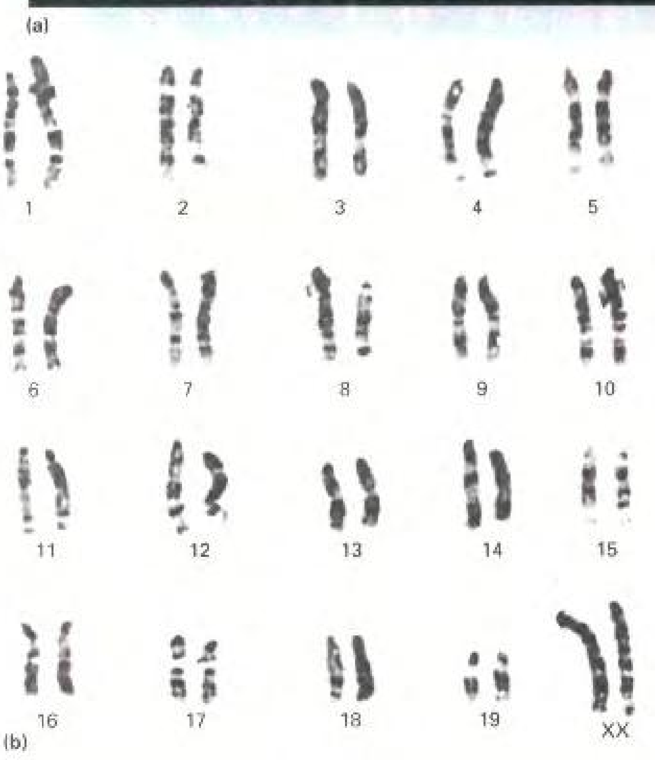


Figura 6-24. (a) Cromosomas humanos teñidos. Con el microscopio, los cromosomas aparecen como un grupo desordenado, como se muestra a la derecha de la fotografía. Para ordenar los cromosomas, se toma una fotografía, se recorta de ella cada cromosoma individual y luego se agrupan según su tamaño y su patrón de bandas, como se muestra a la izquierda. Este grupo de cromosomas corresponde a un varón. (b) Como comparación, se muestran los cromosomas de una hembra de ratón. Para un ojo experimentado, los cromosomas de ratón se distinguen fácilmente de los cromosomas humanos, algo necesario en el método de localización de genes mediante híbridos celulares hombre-ratón. (Parte a cortesía de David Ward, Yale University School of Medicine; parte b cortesía de Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME.)

una está junto a la otra. Sin embargo, es muy pequeño en comparación con una célula, así que las dos células a las que se une el virus quedan realmente en estrecho contacto. De hecho, las membranas de las dos células pueden fusionarse y las dos células se convierten en una: un heterocarionte binucleado.

Si se mezclan suspensiones de células humanas y de ratón en presencia de virus Sendai, que ha sido desactivado con luz ultravioleta, el virus media la fusión de las células de especies diferentes (Fig. 6-23). Cuando las células se han fusionado, los núcleos también lo hacen, formándose una línea celular mononucleada que contiene dotaciones cromosómicas humanas y de ratón. Las dos dotaciones cromosómicas pueden distinguirse fácilmente en las células híbridas, ya que los cromosomas humanos y de ratón son distintos en tamaño y forma. Sin embargo, a lo largo de las sucesivas divisiones celulares, por razones desconocidas, los cromosomas humanos son gradual y aleatoriamente eliminados del híbrido. Quizás este proceso es análogo a la haploidización en el hongo *Aspergillus*.

La pérdida de cromosomas humanos puede detenerse, para facilitar la formación de un híbrido parcial estable, de la forma que se explica a continuación. Las células utilizadas son mutantes en alguna función bioquímica, de tal forma que para crecer

CUADRO 6-2. Comparación de cinco líneas celulares híbridas

		LÍNEAS CELULARES HÍBRIDAS				
		A	B	C	D	E
Genes humanos	1	+	−	−	+	−
	2	−	+	−	+	−
	3	+	−	−	+	−
	4	+	+	+	−	−
Cromosomas humanos	1	−	+	−	+	−
	2	+	−	−	+	−
	3	−	−	−	+	+

la función que falta tiene que ser aportada por el otro genoma. Este procedimiento selectivo termina por estabilizar a células híbridas que contienen una dotación completa de cromosomas de ratón y un grupo pequeño de cromosomas humanos. Éstos varían en número y tipo de un híbrido a otro, pero incluyen siempre el cromosoma humano que aporta el alelo silvestre del gen defectuoso en el genoma de ratón.

Veamos cuáles son los genes concretos que permiten que este procedimiento de selección funcione. El DNA se puede sintetizar en las células *de novo* (a partir de compuestos simples) o mediante una ruta de recuperación de esqueletos moleculares ya disponibles. El método de selección implica la aplicación de un compuesto químico, la aminopterina, que bloquea la ruta de síntesis *de novo*, restringiendo la síntesis de DNA a la ruta de recuperación. Dos enzimas esenciales de esta ruta, la quinasa de timidina (TK) y la transferasa de fosforribosilo de hipoxantina y guanina (HGPRT), son importantes en este procedimiento, como indican las dos reacciones siguientes:

$$\text{timina} \xrightarrow{\text{TK}} \text{ácido timidílico (un precursor del DNA)}$$

$$\text{hipoxantina} \xrightarrow{\text{HGPRT}} \text{ácido inosínico (un precursor del DNA)}$$

La línea celular de ratón que se emplea en la fusión es genéticamente incapaz de producir TK porque es homocigótica para el alelo tk^-, mientras que la línea de células humanas es genéticamente incapaz de producir HGPRT porque es homocigótica para el alelo $hgprt^-$. Así pues, los fenotipos de las dos líneas celulares que se fusionan son:

Ratón: tk^-/tk^-; $hgprt^+/hgprt^+$
Hombre: tk^+/tk^+; $hgprt^-/hgprt^-$

Como cada una carece de una de las enzimas, ni la línea humana ni la de ratón pueden fabricar DNA independientemente. En las células híbridas, sin embargo, el alelo tk^+ complementa al alelo $hgprt^-$, gracias a lo cual las células fabrican la dos enzimas, sintetizan DNA y proliferan. La mayoría de los cromosomas humanos son eliminados de los cultivos de células híbridas, porque su pérdida no tiene efecto alguno sobre la capacidad de crecer de dichos cultivos. Pero, para continuar creciendo en el medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (*medio HAT*), un cultivo híbrido debe retener al menos uno de los cromosomas humanos que lleva el alelo tk^+.

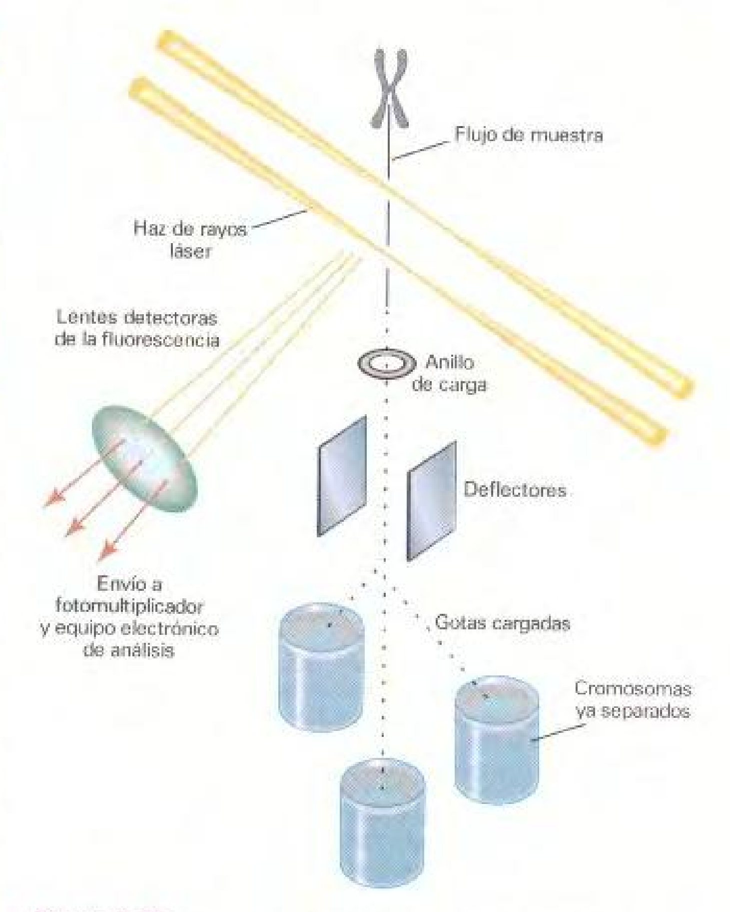


Figura 6-25. Purificación de cromosomas mediante citometría de flujo. Los cromosomas se tiñen con un compuesto fluorescente y se pasan a través de un haz de rayos láser. Se mide la intensidad de la fluorescencia de cada cromosoma que pasa y, de acuerdo con ella, es desviado al tubo colector correspondiente. Los cromosomas se recogen en pequeñas gotas.

Afortunadamente, la eliminación progresiva de cromosomas humanos de las líneas celulares fusionadas puede seguirse con el microscopio, porque los cromosomas de ratón se distinguen bien de los de los humanos. Además, colorantes como la quinacrina y el Giemsa tiñen los cromosomas generando un patrón de bandas. El tamaño y posición de esas bandas varía de un cromosoma a otro, pero la distribución de bandas en cada cromosoma es muy específica y constante. Así pues, resulta fácil identificar los cromosomas humanos presentes en cualquier célula híbrida (Fig. 6-24). Distintas células híbridas se cultivan por separado, formando líneas celulares. Al final se constituye un banco de líneas en las que, en conjunto, están representados todos los cromosomas humanos.

Con un banco completo de cromosomas, podemos comenzar a asignar genes o marcadores a cromosomas. Si la dotación cromosómica humana es homocigótica para un marcador molecular humano —como un alelo que controla un antígeno de superficie, un requerimiento nutricional, una proteína específica o un marcador de DNA —entonces puede establecerse una correlación entre la presencia o ausencia de este marcador genético en cada línea de células híbridas y la presencia o ausencia de ciertos cromosomas humanos en dichas líneas. Datos de este tipo se pre-

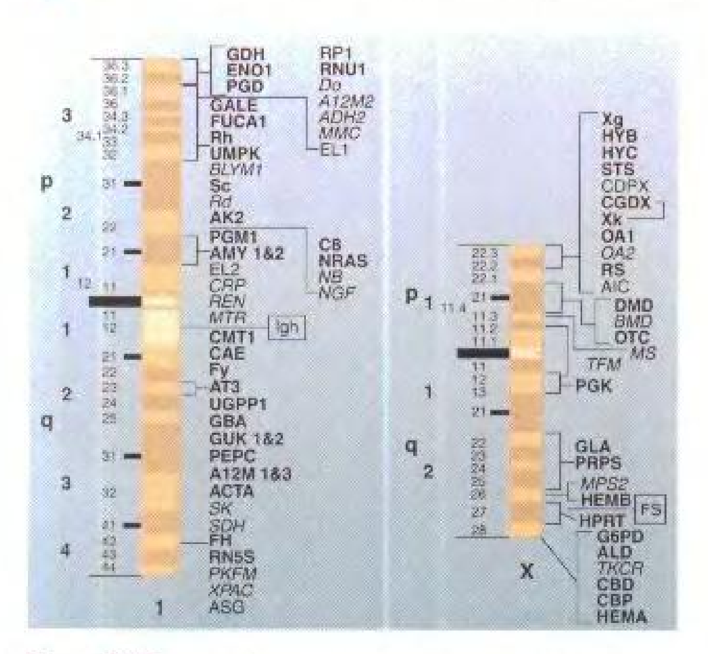


Figura 6-26. Mapa del cromosoma 1 y del cromosoma X humanos. Los loci se indican con abreviaturas. Muchas de éstas derivan del nombre de la proteína cifrada en el gen; otras representan loci marcadores identificados sólo como variantes de DNA. Estos loci identificados con alguna sonda molecular se cartografían bien con los métodos de hibridación de células somáticas. Algunos de estos loci son interesantes por sí mismos, y otros son útiles como marcadores cromosómicos respecto a los cuales pueden cartografiarse otros loci. En cuanto a los autosomas, como el cromosoma 1, aproximadamente $\frac{2}{3}$ de los loci se han localizado mediante híbridos somáticos y el resto mediante análisis de pedigríes. Compare estos mapas con los de la primera página del Capítulo 5, que incluyen la lista de genes de estos cromosomas que determinan varias enfermedades y otros fenotipos. Muchas de estas condiciones se deben a la modificación de una proteína. Las letras p y q indican los brazos cromosómicos corto y largo, respectivamente. (Tomado de V. A. McKusick, *Genetic Maps*, Vol. 2. Editado por S. J. O'Brien. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.)

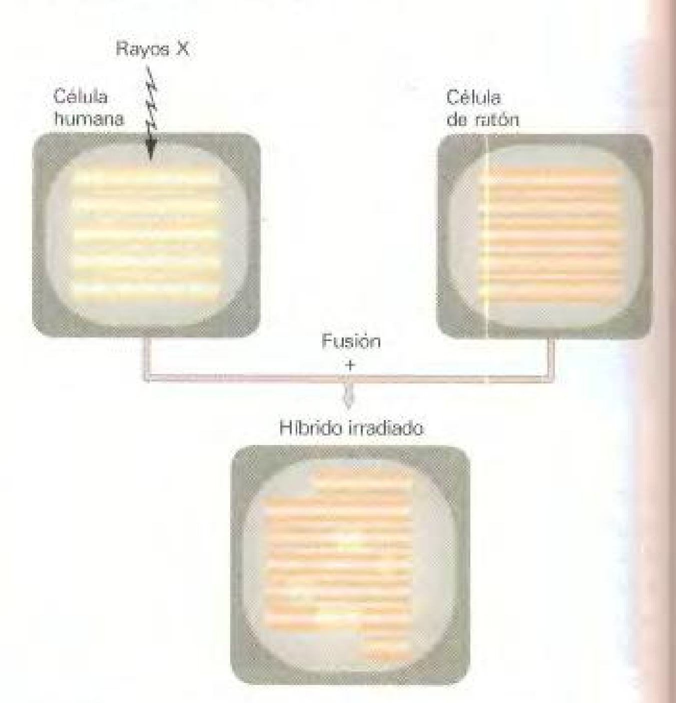


Figura 6-27. Generación de híbridos irradiados con rayos X. Los fragmentos de los cromosomas humanos se integran en los del ratón. El análisis de la presencia simultánea de marcadores humanos en un panel de varios híbridos irradiados puede desvelar la existencia de ligamiento.

sentan en el Cuadro 6-2, en el que signo «+» indica presencia y el signo «−» ausencia del marcador genético. Podemos ver que en las diferentes líneas celulares híbridas, los marcadores genéticos 1 y 3 están presentes o ausentes siempre a la vez. Podemos concluir, entonces, que están ligados. Además, su presencia o ausencia correlaciona con la presencia o ausencia del cromosoma 2, por lo que podemos asumir que estos genes están localizados en el cromosoma 2. Por el mismo razonamiento, el gen 2 tiene que estar en el cromosoma 1, mientras que la localización del gen 4 resulta imposible de establecer. Hoy día, un gran número de genes humanos se han asignado a cromosomas concretos siguiendo esta técnica.

Cartografía de cromosomas

En el apartado anterior, estudiamos la utilización de híbridos celulares hombre-ratón para asignar genes a cromosomas. Este procedimiento puede extenderse para obtener datos para llevar a cabo una cartografía. Una extensión del procedimiento de híbridos celulares se denomina **transferencia de genes mediada por cromosomas**. En primer lugar, se aíslan muestras de cromosomas individuales mediante **separación de cromosomas activada por fluorescencia (FACS**, del inglés *fluorescence-activated chromosome sorting*) (Fig. 6-25). En esta técnica, los cromosomas metafásicos se tiñen con dos colorantes, uno que se une a regiones ricas en pares AT y otro que lo hace a regiones ricas en pares GC. Luego, las células se rompen para que liberen los cromosomas completos y así obtener una suspensión líquida de los mismos. Esta suspensión se pasa a un pulverizador en el que la concentración de cromosomas es tal que cada gota producida por el mismo contiene un solo cromosoma. La solución pulverizada se pasa a través de un rayo láser calibrado para excitar la fluorescencia. Cada cromosoma produce una señal fluorescente característica, que es reconocida electrónicamente para que dos placas deflectoras dirijan las gotas que contienen el cromosoma deseado a un tubo colector.

A continuación, una muestra del cromosoma específico que se está estudiando se añade a células de roedor. Las células de roedor se tragan los cromosomas humanos incorporando el cromosoma completo o fragmentos del mismo en su núcleo. Entonces se relaciona la presencia de marcadores humanos con fragmentos del cromosoma humano. Cuanto más cerca se encuentren dos marcadores humanos en un cromosoma, con mayor frecuencia se transfieren juntos. Algunos resultados de este tipo de cartografía se muestran en la Figura 6-26.

Un segundo método, la **cartografía con híbridos irradiados**, es una extensión de la tranferencia de genes mediada por cromosomas, que está diseñada para generar un mapa de mayor resolución de marcadores moleculares distribuidos por todo un cromo-

soma. La técnica consiste en irradiar células humanas con 3000 rads de rayos X para fragmentar los cromosomas. A continuación, las células irradiadas se fusionan con células de ratón para formar una colección de diferentes híbridos. En este caso, los híbridos tienen un conjunto de fragmentos de los cromomas humanos, como se ilustra en la Figura 6-27. La mayoría de los fragmentos están embebidos en los cromosomas de ratón, pero también puede encontrarse cromosomas humanos truncados. En primer lugar, se calcula la frecuencia de varios marcadores moleculares en los híbridos. El siguiente paso consiste en calcular la frecuencia con que aparecen simultáneamente parejas de marcadores moleculares humanos. Se asume que los marcadores estrechamente ligados se incorporarán juntos con una frecuencia alta, ya que la probabilidad de que la rotura inducida por la radiación ocurra entre los dos loci es baja. Los marcadores que están muy separados y los marcadores de cromosomas diferentes deben retenerse con una frecuencia próxima al producto de las frecuencias de retención de cada marcador por separado. Se calcula una unidad cartográfica, cR_{3000}, que ha sido calibrada a aproximadamente 0.1 cM (m.u.).

Una de las ventajas de esta técnica es el tamaño de la muestra, ya que puede manejarse de una forma relativamente fácil un número grande de híbridos irradiados. Una colección estándar de 100 a 200 híbridos es suficiente para generar un «mapa cR_{3000}» de alta resolución del genoma humano, con una resolución diez veces mayor que un mapa basado en RF.

COROLARIO

La relación entre marcadores humanos y cromosomas en líneas celulares híbridas hombre-ratón permite asignar los marcadores a cromosomas. La presencia simultánea de diferentes marcadores humanos en híbridos irradiados con rayos X permite la cartografía de alta resolución de las posiciones cromosómicas de los marcadores.

RESUMEN

La distancia de mapa no está directamente relacionada con la frecuencia de recombinación debido a la existencia de entrecruzamientos múltiples. La relación matemática entre la distancia de mapa y la frecuencia de recombinación se denomina función de mapa. La distribución de Poisson de los entrecruzamientos en la meiosis puede utilizarse para idear una función de mapa.

El análisis de tétradas se utiliza para estudiar meiosis individuales. El análisis de tétradas es posible en aquellos hongos y algas unicelulares en los que los cuatro productos de cada meiosis permanecen juntos hasta la dispersión de las esporas.

Las tétradas pueden ser ordenadas (lineales) o desordenadas. El análisis de las tétradas lineales nos permite cartografiar los loci entre sí y respecto a sus centrómeros. En aquellos cruzamientos en los que los parentales difieren en dos loci, las ascas que llevan tétradas lineales o desordenadas pueden clasificarse en ditipo parental (DP), ditipo no parental (DNP) y tetratipo (T). A partir de estas clases, la frecuencia de recombinación puede calcularse utilizando la fórmula $RF = DPN + \frac{1}{2}T$. Una fórmula distinta, $50(T + 6DNP)$, nos da una distancia de mapa en la que se ha corregido el efecto de los entrecruzamientos dobles. En organismos haploides, el análisis de la recombinación mediante una muestra de productos meióticos escogidos al azar es más fácil que en diploides.

Aunque los fenómenos de segregación y recombinación suelen considerarse como típicamente meióticos, a veces puede ocurrir que los alelos segreguen y recombinen durante la mitosis. La segregación mitótica se identificó por primera vez en los años treinta, cuando Calvin Bridges observó sectores de cerdas M^{-} en el cuerpo de una hembra M^{+}/M de *Drosophila* de fenotipo predominantemente *M*. Bridges concluyó que estos sectores eran consecuencia de una segregación cromosómica anormal en la mitosis. Casi de forma simultánea, Curt Stern observó sectores gemelos en *Drosophila* y supuso que debían tratarse de los dos productos recíprocos de un entrecruzamiento mitótico. El entrecruzamiento mitótico hace homocigóticos a todos los genes heterocigóticos localizados distalmente con respecto al sito donde ocurre el entrecruzamiento. Este principio puede usarse para deducir la posición de los genes en el mapa y las distancias que los separan. Algunos hongos constituyen sistemas adecuados para el estudio de la recombinación mitótica.

Si un gen ha sido clonado, el clon puede marcarse y utilizarse en hidridación *in situ* de cromosomas. La posición donde la sonda se une muestra el locus del gen. Las células híbridas hombre-ratón pierden los cromosomas humanos espontáneamente. La comparación de los cromosomas retenidos con los genes retenidos permite asignar estos últimos a loci cromosómicos.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

distancia de mapa / función de mapa / mapa de ligamiento / frecuencia de recombinación / análisis de tétradas / cartografía del centrómero / segregación en la segunda división / corrección de entrecruzamientos dobles / meiosis individuales

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

Las cepas del hongo haploide *Neurospora* que llevan el alelo *am* no crecen, a menos que se añada alanina al medio de cultivo. Las cepas silvestres normales crecen sin necesidad de alanina. Ligado al locus *am* se encuentra un gen supresor, *ssu*. El alelo *ssu* suprime el requerimiento de alanina, así que las cepas *am ssu* no requieren dicho compuesto para crecer. El alelo *ssu* no tiene efecto alguno sobre el alelo silvestre am^+ y, además, el alelo ssu^+ no tiene efecto conocido sobre ninguno de los alelos del locus *am*.

Se ha establecido que la frecuencia de entrecruzamientos triples, o de mayor orden, en la región entre *am* y *ssu* es insignificante. Así, en las meiosis se producen cero entrecruzamientos (41 %), un entrecruzamiento (39 %) o dos entrecruzamientos (20 %). Teniendo en cuenta estos datos, responda las preguntas siguientes:

a. ¿En qué sentido el sistema descrito está condicionado por el medio ambiente?

b. ¿Cuál es el valor de la frecuencia de recombinación (RF)?

c. Si se escogen al azar ascosporas del cruzamiento *am ssu* × am^+ ssu^+, ¿qué proporción de ellas requerirá alanina para crecer?

d. ¿Cuál es la distancia entre los dos loci, en unidades de mapa corregidas?

e. Si se analizan ascas que contienen tétradas desordenadas del cruzamiento *am ssu* × am^+ ssu^+, ¿en qué proporción de ellas aparecerán las siguientes distribuciones fenotípicas?

Distribución	Número de ascosporas que no requieren alanina	Número de ascosporas que requieren alanina
1	8	0
2	6	2
3	4	4
4	2	6
5	0	8

♦ Solución ♦

a. El único aspecto relacionado con el medio ambiente que se menciona es la alanina como parte del medio de cultivo. Si hay alanina en el medio, no podemos identificar los dos fenotipos básicos, el fenotipo de capacidad de crecer y el fenotipo de incapacidad de crecer. Por tanto, la posibilidad de estudiar y analizar este interesante caso de interacción genética está condicionada por el medio ambiente, porque el punto de partida de cualquier tipo de análisis genético es la variación, y sin ella no hay estudio posible. Otro aspecto de relevancia es que probablemente el alelo *am* sería letal en el medio ambiente natural; es sólo porque los científicos propagan tales fenotipos (en este caso, en un medio de cultivo especial, es decir, en un ambiente especial) por lo que podemos contar con ellos para estudiarlos.

b. Este capítulo nos ha facilitado la fórmula para calcular la RF a partir del análisis de tétradas. Hemos aprendido que RF = T/2 + DNP. Sin embargo, no sabemos cuáles son los valores de T y DNP, así que tendremos que calcularlos. Nos han dicho cuál es la frecuencia de meiosis con 0, 1 y 2 entrecruzamientos, y sabemos cómo se producen las clases DP, T y DNP en tales meiosis. Contamos pues con todo lo necesario para calcular las frecuencias que necesitamos. Las ascas en las que no ha habido entrecruzamientos son todas DP, así que éstas contribuyen con un 41 % a la clase DP. El caso de los entrecruzamientos sencillos es también fácil; éstos producen sólo ascas T, contribuyendo, por tanto, con un 39 % a la clase T. El caso de los entrecruzamientos dobles es algo más complicado, pero hemos visto que producen $\frac{1}{4}$DP, $\frac{1}{2}$T y $\frac{1}{4}$DNP, lo cual produce un 5 % de DP, un 10 % de T y un 5 % de DNP. Sumando estos porcentajes a los valores anteriores, tenemos un 46 % de la clase DP, un 49 % de T y un 5 % de DNP. Ahora, podemos calcular el valor de la RF, que es $\frac{49}{2} + 5 = 29.5$ %.

c. Sabemos ya que la proporción de recombinantes en las ascosporas del cruzamiento es del 29.5 %, incluidas las dos clases recombinantes, *am* ssu^+ y am^+ *ssu*, cada una de las cuales aparecerá en la proporción del 14.75 %. Las dos clases parentales son *am ssu* y am^+ ssu^+ y esperamos que constituyan la diferencia 100 − 29.5 = 70.5 %, correspondiendo a cada clase parental una proporción del 35.25 %. ¿Cuáles de los cuatro genotipos requerirán alanina para crecer? Obviamente, el genotipo am^+ ssu^+ no, ni tampoco el genotipo *am ssu*. El genotipo am^+ *ssu* tampoco requerirá alanina, porque lleva el alelo silvestre del locus *am* y nos han dicho que *ssu* no afecta a dicho alelo. Sin embargo, el genotipo *am* ssu^+ carece del alelo supresor y requerirá alanina, así que la respuesta es 14.75 %, la frecuencia esperada de esa clase.

d. Hemos estudiado en este capítulo que, conociendo la frecuencia de las clases DP, T y DNP, obtenidas en un análisis de tétradas desordenadas, podemos usar sus valores para corregir el efecto de los entrecruzamientos dobles, que siempre tienden a rebajar las distancias de mapa. La fórmula es 50(T + 6 DNP). Aplicando los valores que hemos calculado, tenemos 50(0.49 + 0.30) que equivale a 39.5 unidades de mapa corregidas.

e. Ya hemos realizado la mayoría de los razonamientos necesarios para resolver esta parte del problema, porque hemos deducido que el único genotipo que provoca necesidad de alanina para crecer es el genotipo *am* ssu^+. Como sabemos que en un análisis de tétradas desordenadas para dos loci heterocigóticos sólo hay tres tipos de ascas (DP, T y DNP), simplemente tenemos que deducir cuántas ascosporas *am* ssu^+ aparecerán en cada una de ellas. En las ascas DP no habrá genotipos *am* ssu^+, así que en estas ascas observaremos una razón 8:0. Las ascas tetratipo (T) contienen un par de esporas de genotipo *am* ssu^+, así que observaremos en ellas una razón 6:2. Las ascas de la clase DNP estarán compuestas por cuatro ascosporas *am* ssu^+ y cuatro am^+ *ssu*, produciendo así una razón 4:4. Y eso cubre todas las posibilidades, así que podemos responder que las proporciones de los distintos tipos de la tabla son: (1) 46 %, (2) 49 %, (3) 5 %, (4) 0 %, (5) 0 %.

Para resumir, fíjese en los conceptos de capítulos previos que hemos empleado: segregación mendeliana, herencia cromosómica, interacción génica, efectos letales, efectos ambientales, entrecruzamiento y cartografía genética.

PROBLEMAS RESUELTOS

1. Se realiza un cruzamiento entre una estirpe haploide de *Neurospora* de genotipo $nic^+ \cdot ad$ y otra estirpe haploide de genotipo $nic \cdot ad^+$. De este cruzamiento, se aíslan un total de 1000 ascas ordenadas y se clasifican del siguiente modo:

1	2	3	4	5	6	7
$nic^+ \cdot ad$	$nic^- \cdot ad$	$nic^+ \cdot ad$	$nic^+ \cdot ad$	$nic^+ \cdot ad$	$nic^+ \cdot ad^-$	$nic^+ \cdot ad^-$
$nic^+ \cdot ad$	$nic^+ \cdot ad^+$	$nic^- \cdot ad^+$	$nic^+ \cdot ad$	$nic^+ \cdot ad$	$nic^+ \cdot ad^-$	$nic^+ \cdot ad^-$
$nic^+ \cdot ad$	$nic^+ \cdot ad^+$	$nic^+ \cdot ad$	$nic \cdot ad$	$nic \cdot ad^+$	$nic \cdot ad$	$nic \cdot ad$
$nic^+ \cdot ad$	$nic^+ \cdot ad^+$	$nic^+ \cdot ad$	$nic \cdot ad$	$nic \cdot ad^+$	$nic \cdot ad$	$nic \cdot ad$
$nic \cdot ad^+$	$nic \cdot ad$	$nic \cdot ad^-$	$nic^+ \cdot ad^+$	$nic^- \cdot ad$	$nic^+ \cdot ad^-$	$nic^+ \cdot ad$
$nic \cdot ad^+$	$nic \cdot ad$	$nic \cdot ad^-$	$nic^+ \cdot ad^+$	$nic^- \cdot ad$	$nic^+ \cdot ad^-$	$nic^+ \cdot ad$
$nic \cdot ad^+$	$nic \cdot ad$	$nic \cdot ad$	$nic \cdot ad^+$	$nic \cdot ad^+$	$nic \cdot ad$	$nic \cdot ad^-$
$nic \cdot ad^+$	$nic \cdot ad$	$nic \cdot ad$	$nic \cdot ad^+$	$nic \cdot ad^+$	$nic \cdot ad$	$nic \cdot ad^-$
808	1	90	5	90	1	5

Elabore un mapa que indique las distancias entre los loci *ad* y *nic*, y entre cada uno de ellos y su centrómero.

♦ Solución ♦

¿Qué principios debemos tener en cuenta para resolver este problema? Suele ser buena idea empezar por algo directo, como es calcular las distancias de cada locus a su centrómero. No sabemos si *ad* y *nic* están ligados, pero no importa. La frecuencia de ascas con segregación M_{II} para cada locus nos dará su distancia al centrómero (más adelante nos preocuparemos de si se trata o no del mismo centrómero).

Recuerde que un patrón de segregación M_{II} es cualquier distribución que no esté formada por dos bloques de cuatro. Empecemos con la distancia del locus *nic* al centrómero. Lo único que hay que hacer es sumar las clases de ascas 4, 5, 6 y 7, puesto que todas ellas muestran un patrón de segregación M_{II} para el locus *nic*. El valor es 5 + 90 + 1 + 5 = 101, es decir, 10.1 %. En este capítulo, hemos visto que para convertir este valor en unidades de mapa hay que dividirlo por 2, lo que da 5.05 m.u.

nic

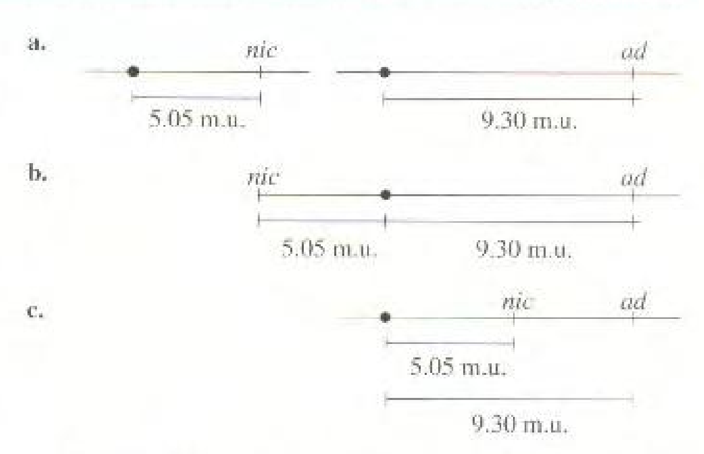
5.05 m.u.

Hacemos lo mismo para el locus *ad*. En este caso el total de ascas con segregación M_{II} viene dado por las clases 3, 5, 6 y 7, y es 90 + 90 + 1 + 5 = 186, o un 18.6 %, que equivale a 9.3 m.u.

ad

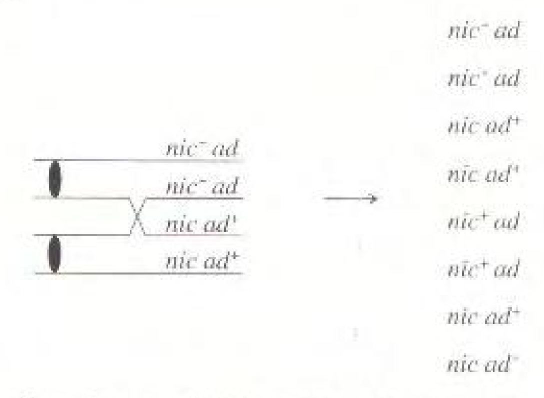
9.30 m.u.

Ahora, considerando todo lo anterior, tenemos que decidir entre las siguientes alternativas, todas ellas compatibles con las distancias al centrómero calculadas previamente:



Una combinación de sentido común y análisis sencillo nos dice cuál de las alternativas es la correcta. En primer lugar, el examen de las ascas revela que la clase más común es la número 1, que representa más del 80 % de todas las ascas. Esta clase contiene solamente los genotipos nic^+ *ad* y *nic* ad^-, que son los genotipos *parentales*. Así que sabemos que la recombinación es poco frecuente y que ciertamente los loci están ligados. Esto nos lleva a descartar la alternativa a.

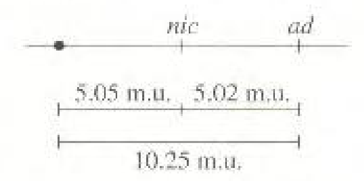
Consideremos ahora la alternativa c. Si esta alternativa fuese correcta, un entrecruzamiento entre el centrómero y *nic* originaría no sólo un patrón de segregación M_{II} para ese locus, sino también para el locus *ad*, ya que éste está más alejado del centrómero. Las distribuciones en el asca que generaría esta alternativa serían:



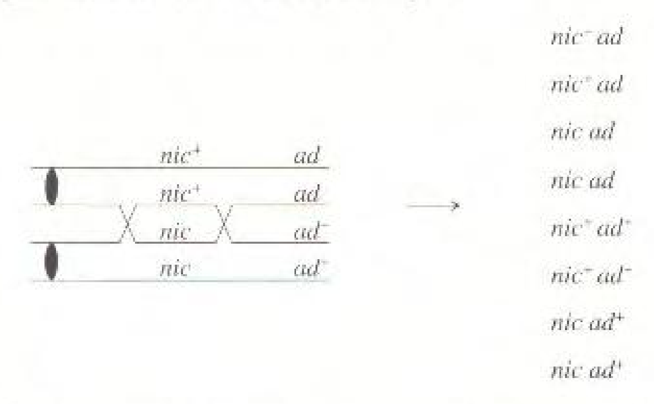
Recuerde que las ascas 4, 5, 6 y 7 (un total de 101 ascas) son de tipo M_{II} para el locus *nic*. De ellas, el tipo 5 es precisamente el que estamos buscando e incluye a 90 ascas. Por tanto, la alternativa c parece correcta, dado que las ascas de tipo 5 constituyen alrededor del 90 % de las ascas M_{II} para el locus *nic*. Esta relación no se mantendría si la alternativa correcta fuese la b, puesto que los entrecruzamientos a cada lado del centrómero generarían patrones de segregación M_{II} independientes para *nic* y para *ad*.

¿Es la distancia de mapa entre *nic* y *ad* simplemente 9.30 – – 5.05 = 4.25 m.u.? Este valor es casi exacto, pero no del todo. Siempre, el mejor modo de calcular las distancias de mapa entre loci génicos es medir la frecuencia de recombinación (RF). Podríamos examinar todas las ascas y contar todas las ascosporas recombinantes, pero es más sencillo utilizar la fórmula RF = $\frac{1}{2}$T + DNP.

Las ascas T son las clases 3, 4 y 7, y las ascas DNP son las clases 2 y 6. De aquí, RF = $[\frac{1}{2}(100) + 2]/1000 = 5.2\%$, ó 5.2 m.u., y un mapa más correcto es:



El motivo de que se subestime la distancia entre *ad* y el centrómero, si se calcula a partir de la frecuecia de M_{II} es la existencia de entrecruzamientos dobles, que pueden originar un patrón M_I para *ad*, como ocurre en las ascas de tipo 4.



2. En *Aspergillus*, los alelos recesivos *leu1*, *met5*, *thi3*, *pro2* y *ad2*, situados en el cromosoma VI, provocan requerimiento de leucina, metionina, tiamina, prolina y adenina, respectivamente, para crecer, mientras que sus alelos silvestres eliminan esos requerimientos. En el extremo del cromosoma VI se encuentra el locus del alelo recesivo *su*, el cual suprime a *ad2*, de manera que las estirpes que expresan *ad2* y *su* no requieren adenina. Se construye una estirpe diploide, combinando los dos genotipos haploides que se indican a continuación, donde los loci, exceptuando *su*, no están escritos en ningún orden particular:

su *leu1* *met5* *thi3* *pro2* *ad2*

y

su^+ $leu1^+$ $met5^+$ $thi3^+$ $pro2^-$ *ad2*

Se siembran esporas asexuales diploides sobre un medio enriquecido con todos los requerimientos excepto adenina. La mayoría de las esporas no crece, debido a la recesividad de *su*, pero una minoría sí da lugar a colonias. Se escogen 100 de estas colonias y se examina su fenotipo para los otros marcadores. Se encuentran las cuatro clases siguientes (advierta que se trata de fenotipos diploides, no genotipos haploides):

(1)	*su*	leu^-	met^-	thi^+	pro^-	ad^-	60
(2)	*su*	leu^-	met^-	thi^+	pro^+	ad^-	25
(3)	*su*	leu^+	met^+	thi^+	pro^+	ad^-	10
(4)	*su*	leu^-	met^-	thi^-	pro^-	ad^-	5

a. Explique cómo se producen estas cuatro clases fenotípicas y por qué aparecen en esas proporciones relativas.

b. ¿Por qué cree que no se obtuvieron colonias que expresaran el alelo *pro2*?

♦ Solución ♦

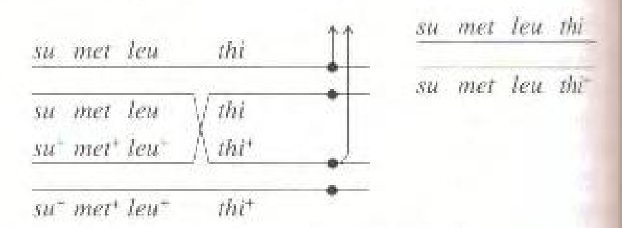
a. El experimento está relacionado con el comportamiento de las células diploides durante la mitosis y, por tanto, las cuatro clases deben explicarse por algún mecanismo mitótico. Parece probable que el alelo *su* se haya hecho homocigótico *su/su* en todas las clases, ya que sólo en esa condición puede suprimir el homocigoto *ad2/ad2* y permitir el crecimiento en ausencia de adenina. Esta fue, pues, la base de la selección original de las 100 colonias. Pero, evidentemente, también se han hecho homocigóticos otros alelos —y en combinaciones diferentes en cada clase—.

En este capítulo se ha demostrado que un entrecruzamiento mitótico puede producir homocigosis para cualquier alelo distal al punto de intercambio. ¿Se pueden explicar las diferentes clases por la producción de entrecruzamientos en regiones distintas del cromosoma VI? El examen de las clases indica que se produjo homocigosis sólo para el alelo *su* (clase 3), para *su* y *met* (clase 1), para *su*, *met* y *leu* (clase 2) o para *su*, *met*, *leu* y *thi* (clase 4). Esto nos revela virtualmente que el orden de los genes debe ser *su-met-leu-thi*-centrómero. Los entrecruzamientos que provocan homocigosis deben ocurrir en las siguientes regiones:

su —— *met* —— *leu* —— *thi* —— centrómero

Clase 3 | Clase 1 | Clase 2 | Clase 4

Por ejemplo, para producir la clase 2 se necesita el siguiente entrecruzamiento:



Los tamaños relativos de las clases deben reflejar las distancias relativas entre los loci, tal como sigue:

su met — *leu* — *thi* — centrómero: 10, 60, 25, 5

Tenga en cuenta que estas unidades son proporciones relativas que no son lo mismo que unidades de mapa meióticas.

b. Nos dicen que alelo *pro2* está en el cromosoma VI y, sin embargo, nunca se hace homocigótico. Advierta que para seleccionar los entrecruzamientos mitóticos hemos hecho uso del alelo *su*, que se encuentra en el extremo de un brazo del cromosoma. Los alelos recesivos situados en el otro brazo no se hacen simultáneamente homocigóticos por esos entrecruzamientos, de manera que *pro2* probablemente está situado en el otro brazo. No hay forma de averiguar dónde está *ad2*, porque se encuentra en homocigosis desde el principio.

PROBLEMAS

1. En *Neurospora*, se realiza el cruzamiento $al\text{-}2^{+} \times al\text{-}2$. El análisis de tétradas lineales revela que la frecuencia de segregación en la segunda división meiótica es del 8 %.

   a. Dibuje dos ejemplos de patrones de segregación en segunda división de este cruzamiento.

   b. ¿Qué se puede calcular utilizando el valor del 8 %?

2. Del cruzamiento $arg\text{-}6 \cdot al\text{-}2 \times arg\text{-}6^{+} \cdot al\text{-}2^{+}$ en una especie de hongo, ¿cuáles serían los genotipos de las esporas en las tétradas desordenadas que fueran

   a. ditipo parental?

   b. tetratipo?

   c. ditipo recombinante?

3. El número medio de entrecruzamientos para una región cromosómica concreta resulta ser de 2 por meiosis. En esa región, ¿qué proporción de meiosis puede predecirse que tendrán

   a. ningún entrecruzamiento?

   b. un entrecruzamiento?

   c. dos entrecruzamientos?

4. En una mosca *Drosophila* de genotipo

   y   *sn*
   2   1
   y^{+} sn^{+}

   y determina cuerpo amarillo e y^{+} cuerpo marrón; *sn* determina cerdas cortas y rizadas y sn^{+} cerdas normales. ¿Qué resultado observaríamos si ocurriera un entrecruzamiento mitótico durante el desarrollo en

   a. la región 1;

   b. la región 2?

5. Cada viernes por la noche, la estudiante de Genética Jean Allele, agotada por el estudio, va a la bolera de la universidad para relajarse un poco. Pero incluso allí le persigue la Genética. La pista de bolos, más bien modesta, cuenta sólo con cuatro bolas: dos rojas y dos azules. Una vez lanzadas contra los bolos, son recogidas y devueltas al azar, viniendo a detenerse al final del carril de devolución. A lo largo de la tarde, conforme las bolas se acercan al punto de parada, Jean percibe combinaciones en el orden de llegada de las cuatro bolas que le resultan familiares. Incorregible, se dedica a contar los distintos patrones que aparecen. ¿Qué patrones observó, con qué frecuencia, y qué relación tienen estas observaciones con la Genética?

6. **a.** Utilice la función de mapa para calcular la distancia corregida entre dos loci cuya frecuencia de recombinación es del 20 %. Recuerde que un valor *m* de 1 equivale a 50 unidades de mapa corregidas.

   b. Si obtiene un valor de RF del 45 % en un experimento, ¿qué puede decir acerca del ligamiento? (Las cifras reales que observó, de un total de 200 descendientes, fueron: 58 y 52 con genotipos parentales, y 47 y 43 con genotipos recombinantes).

7. En levaduras haploides, un cruzamiento entre $arg^{-} \cdot ad^{-} \cdot nic^{+} \cdot leu^{+}$ y $arg^{+} \cdot ad^{+} \cdot nic^{-} \cdot leu^{-}$ produce esporas sexuales haploides, de las que se aíslan 20 al azar. Cuando los cultivos resultantes de cada espora se prueban en varios medios, producen los resultados que aparecen en la tabla adjunta, en la que Arg significa arginina; Ad, adenina; Nic, nicotinamida; Leu, leucina; +, crecimiento; y − falta de crecimiento.

	MEDIO MÍNIMO CON			
Cultivo	Arg, Ad, Nic	Arg, Ad, Leu	Arg, Nic, Leu	Ad, Nic, Leu
1	+	+	−	−
2	−	−	+	+
3	−	+	−	+
4	+	−	+	−
5	−	−	+	+
6	+	+	−	−
7	+	+	−	−
8	−	−	+	+
9	+	−	+	−
10	−	+	−	+
11	−	+	−	+
12	+	−	+	−
13	+	+	−	−
14	+	−	+	−
15	−	+	−	+
16	+	−	−	−
17	+	+	−	−
18	−	−	+	+
19	+	+	−	−
20	−	+	−	+

   a. ¿Qué puede decir sobre las relaciones de ligamiento entre estos genes?

   b. ¿Cuál es el origen del cultivo 16?

8. Imagine que ha medido la frecuencia de recombinación entre los loci ligados ceroso (*wx*) y apergaminado (*sh*) del cromosoma 9 de maíz. La RF es 36 %. ¿En qué proporción de los meiocitos habrá

   a. ningún entrecruzamiento entre los loci *wx* y *sh*?

   b. un entrecruzamiento entre los loci *wx* y *sh*?

   c. dos entrecruzamientos entre los loci *wx* y *sh*?

   d. al menos un entrecruzamiento entre los loci *wx* y *sh*?

*9. En un análisis de tétradas, la relación de ligamiento entre los loci *p* y *q* es la siguiente:



Suponga que:

- En la región i, no se producen entrecruzamientos en el 88 % de las meiosis y se produce un solo entrecruzamiento en el 12 % de las meiosis.
- En la región ii, no se producen entrecruzamientos en el 80 % de las meiosis y se produce un solo entrecruzamiento en el 20 % de las meiosis.
- No existe interferencia (en otras palabras, lo que ocurre en una región no afecta a lo que ocurre en la otra región).

¿Qué proporción de las tétradas pertenecerá a las siguientes clases? **(a)** M_IM_I, DP; **(b)** M_IM_I, DNP; **(c)** M_IM_{II}, T; **(d)** $M_{II}M_I$, T; **(e)** $M_{II}M_{II}$, DP; **(f)** $M_{II}M_{II}$, DNP; **(g)** $M_{II}M_{II}$, T. (**Nota:** el patrón M escrito en primer lugar es el que se refiere al locus *p*) **Pista:** la forma más fácil de resolver este problema es empezar calculando las frecuencias de ascas con entrecruzamientos en ambas regiones, en la región i, en la región ii o en ninguna de las regiones. Luego, determine qué patrones M_I y M_{II} resultan.

10. Se realiza el siguiente cruzamiento con *Neurospora*: $a^+\ b^+\ c^+\ d^+ \times a\ b\ c\ d$ (los loci *a b c* y *d* están ligados y en el mismo orden en que aparecen escritos). Dibuje esquemas con entrecruzamientos en los que se ilustre cómo se producirían las siguientes segregaciones de ascas desordenadas:

a. $a^+\ b^+\ c\ d^+$
$a\ b\ c\ d^+$
$a^+\ b\ c^+\ d$
$a\ b^+\ c^+\ d$

b. $a^+\ b\ c\ d$
$a^+\ b^+\ c^+\ d$
$a\ b\ c\ d^+$
$a\ b^+\ c^+\ d^+$

c. $a^+\ b^+\ c\ d^+$
$a^+\ b\ c^+\ d$
$a\ b^+\ c\ d^+$
$a\ b\ c^+\ d$

d. $a^+\ b\ c^+\ d$
$a^+\ b\ c^+\ d$
$a\ b^+\ c\ d^+$
$a\ b^+\ c\ d^+$

e. $a^+\ b\ c\ d$
$a\ b\ c\ d^+$
$a^+\ b^+\ c^+\ d$
$a\ b^+\ c^+\ d^+$

f. $a^+\ b\ c^+\ d$
$a^+\ b^+\ c^+\ d$
$a\ b\ c\ d^+$
$a\ b^+\ c\ d^+$

g. $a^+\ b\ c^+\ d^+$
$a^+\ b\ c^+\ d^+$
$a\ b^+\ c\ d$
$a\ b^+\ c\ d$

h. $a^+\ b\ c^+\ d$
$a\ b^+\ c\ d^+$
$a^+\ b\ c^+\ d$
$a\ b^+\ c\ d^+$

11. Se realizó un cruzamiento entre dos estirpes de *Neurospora*. Una de ellas portaba el alelo *A* del tipo sexual y el alelo mutante *arg-1* y la otra portaba el alelo *a* del tipo sexual y el alelo silvestre (+) para *arg-1*. Se aislaron 400 tétradas lineales que fueron agrupadas en siete clases. (Cada clase contenía varios órdenes distintos de esporas en la tétrada.)

1	2	3	4	5	6	7
A · arg	*A · +*	*A · arg*	*A · arg*	*A · arg*	*A · +*	*A · +*
A · arg	*A · +*	*A · +*	*a · arg*	*a · +*	*a · arg*	*a · arg*
a · +	*a · arg*	*a · arg*	*A · +*	*A · arg*	*A · +*	*A · arg*
a · +	*a · arg*	*a · +*	*a · +*	*a · +*	*a · arg*	*a · +*
127	125	100	36	2	4	6

a. Indique, mediante un esquema, la relación de ligamiento del locus del tipo sexual y del locus *arg-1*. Incluya el centrómero o centrómeros en el mapa que dibuje. Indique las unidades de mapa en *todos* los intervalos.

b. Dibuje las divisiones meióticas que dieron lugar a las tétradas de clase 6.

El problema paso a paso

1. ¿Son los hongos generalmente haploides o diploides?

2. ¿Cuántas ascosporas hay en una asca de *Neurospora*? ¿Encaja su respuesta con el número que se muestra en este problema? Explique cualquier discrepancia.

3. ¿Qué es tipo sexual en hongos? ¿Cómo cree que se determina experimentalmente?

4. ¿Los símbolos *A* y *a* están relacionados con dominancia y recesividad?

5. ¿Qué significa el símbolo *arg-1*? ¿Cómo determinaría este genotipo?

6. ¿Cómo se relaciona el símbolo *arg-1* con el símbolo +?

7. ¿Qué significa la expresión *silvestre*?

8. ¿Qué significa la palabra *mutante*?

9. ¿Tiene importancia la función biológica de estos alelos a la hora de resolver este problema?

10. ¿Qué significa la expresión *análisis de tétradas lineales*?

11. ¿Qué información puede extraerse del análisis de tétradas lineales que no pueda ser obtenida del análisis de tétradas desordenadas?

12. ¿Cómo se realiza un cruzamiento en un hongo como *Neurospora*? Explique cómo aislar ascas y ascosporas individuales. ¿Cómo se relaciona el termino *tétrada* con *asca* y *óctada*?

13. ¿Dónde tiene lugar la meiosis en el ciclo de vida de *Neurospora*? (Indíquelo en un esquema del ciclo de vida.)

14. ¿Qué relación hay entre el Problema 11 y la meiosis?

15. ¿Puede escribir los genotipos de las dos estirpes parentales?

16. ¿Por qué sólo se muestran cuatro genotipos en cada clase?

17. ¿Por qué aparecen sólo siete clases? ¿Cuántas formas distintas conoce para clasificar generalmente tétradas? ¿Cuál de estas clasificaciones puede aplicarse tanto a tétradas lineales como desordenadas? ¿Puede aplicar estas clasificaciones a las tétradas de este problema? (Clasifique cada clase en tantas formas como le sea posible) ¿Cree que podrían aparecer otras clases en este cruzamiento? En caso afirmativo, ¿por qué no se muestran?

18. ¿Qué significa «cada clase contenía órdenes distintos de esporas en la tétrada»? ¿Por qué estos órdenes distintos de esporas no cambian la clase?

19. ¿Por qué no se muestra la clase siguiente?

$a \cdot +$
$a \cdot +$
$A \cdot arg$
$A \cdot arg$

20. ¿Qué significa la expresión *relación de ligamiento*?

21. ¿Qué es un *intervalo* genético?

22. ¿Por qué el problema dice «centrómero o centrómeros» y no sólo «centrómero»? ¿Cuál es método general para cartografiar centrómeros en el análisis de tétradas?

23. ¿Cuál es la frecuencia total de ascosporas $A \cdot +$? (¿Calculó esta frecuencia usando una fórmula o contándolas? ¿Es un genotipo recombinante? En caso afirmativo, ¿es el único genotipo recombinante?)

24. Las dos primeras clases son las más abundantes y su frecuencia es aproximadamente la misma. ¿Qué le sugiere está información? ¿Cuál es su contenido en genotipos parentales y recombinantes?

12. En el hongo *Neurospora*, una estirpe auxótrofa para tiamina (alelo mutante t) se cruzó con una estirpe auxótrofa para metionina (alelo mutante m). Se aislaron ascas lineales que se clasificaron en los siguientes grupos.

Parejas de esporas	Tipos de ascas					
1 y 2	$t \cdot +$	$t \cdot +$	$t \cdot +$	$t \cdot +$	$t \cdot m$	$t \cdot m$
3 y 4	$t \cdot +$	$t \cdot m$	$+ \cdot m$	$+ \cdot +$	$t \cdot m$	$+ \cdot +$
5 y 6	$+ \cdot m$	$+ \cdot +$	$t \cdot +$	$t \cdot m$	$+ \cdot +$	$t \cdot +$
7 y 8	$+ \cdot m$	$+ \cdot m$	$+ \cdot m$	$+ \cdot m$	$+ \cdot +$	$+ \cdot m$
Número	260	76	4	54	1	5

a. Determine la relación de ligamiento de estos dos genes con su centrómero o centrómeros y entre ellos. Indique las distancias en unidades de mapa.

b. Indique mediante esquemas cómo se origina cada tipo de asca.

c. Si se siembran 1000 ascosporas seleccionadas al azar en medio mínimo, ¿cuántas crecerán formando colonias?

13. Se estudian 11 parejas diferentes de loci de *Neurospora* mediante cruzamientos del tipo $a \cdot b \times a^{-} \cdot b^{+}$ y análisis de 100 ascas ordenadas de cada cruzamiento. Por conveniencia, a la hora de hacer una tabla se organizan los datos designando las once parejas de loci de la misma manera —a y b—, como se indica a continuación:

NÚMERO DE ASCAS DE TIPO

Cruzamiento	$a \cdot b$ $a \cdot b$ $a^{+} \cdot b^{+}$ $a^{+} \cdot b^{+}$	$a \cdot b^{-}$ $a \cdot b^{-}$ $a^{-} \cdot b$ $a^{-} \cdot b$	$a \cdot b$ $a \cdot b^{+}$ $a^{+} \cdot b^{+}$ $a^{+} \cdot b$	$a \cdot b$ $a^{+} \cdot b$ $a^{+} \cdot b^{+}$ $a \cdot b^{+}$	$a \cdot b$ $a^{-} \cdot b^{+}$ $a^{-} \cdot b^{+}$ $a \cdot b$	$a \cdot b^{-}$ $a^{+} \cdot b^{-}$ $a^{+} \cdot b$ $a \cdot b^{-}$	$a \cdot b^{+}$ $a^{-} \cdot b$ $a^{+} \cdot b^{+}$ $a \cdot b$
1	34	34	32	0	0	0	0
2	84	1	15	0	0	0	0
3	55	3	40	0	2	0	0
4	71	1	18	1	8	0	1
5	9	6	24	22	8	10	20
6	31	0	1	3	61	0	4
7	95	0	3	2	0	0	0
8	6	7	20	22	12	11	22
9	69	0	10	18	0	1	2
10	16	14	2	60	1	2	5
11	51	49	0	0	0	0	0

Para cada cruzamiento, calcule las distancias de mapa entre los dos loci y entre cada uno de ellos y su centrómero.

14. En *Neurospora*, el locus a se encuentra en el cromosoma 1 a 5 m.u. del centrómero. El locus b está en el cromosoma 7 a 10 m.u. del centrómero. Del cruzamiento a ; $b^{+} \times a^{-}$; b, determine las frecuencias de: **(a)** las ascas ditipo parental, **(b)** las ascas ditipo no parental, **(c)** las ascas tetratipo, **(d)** las ascosporas recombinantes, y **(e)** las ascosporas silvestres. (**Nota:** no es necesario que se complique con funciones de mapa).

15. Se analizan tres cruzamientos distintos de *Neurospora* empleando tétradas desordenadas. Cada cruzamiento implica a dos parejas distintas de genes ligados. Los resultados son los siguientes:

Cruzamiento	Parentales	Ditipo parental (%)	Tetratipo (%)	Ditipo no parental (%)
1	$a \cdot b^{+} \times a^{+} \cdot b$	51	45	4
2	$c \cdot d^{-} \times c^{-} \cdot d$	64	34	2
3	$e \cdot f^{-} \times e^{-} \cdot f$	45	50	5

Calcule para cada cruzamiento:

a. La frecuencia de recombinación (RF).

b. La distancia de mapa sin corregir, basada en la RF.

c. La distancia de mapa corregida, basada en las frecuencias de tétradas.

16. Un genetista cruza dos cepas de levadura que difieren en los loci ligados *ura3* (que controla el requerimiento de uracilo) y *lys4* (que controla el requerimiento de lisina):

ura3 lys4^{+} × *ura3*$^{+}$ *lys4*

El genetista aísla 300 tétradas *desordenadas* y las clasifica como sigue:

ura3 lys4^{+}	*ura3 lys4*	*ura3 lys4*$^{+}$
ura3^{+} *lys4*	*ura3 lys4*	*ura3 lys4*$^{+}$
ura3 lys4	*ura3*$^{-}$ *lys4*$^{+}$	*ura3*$^{+}$ *lys4*
ura3^{+} *lys4*$^{+}$	*ura3*$^{-}$ *lys4*$^{+}$	*ura3*$^{+}$ *lys4*
138	12	150

a. ¿Cuál es la frecuencia de recombinación?

b. Si suponemos que entre estos loci pueden ocurrir ninguno, uno o dos entrecruzamientos (no más) durante la meiosis, ¿cuáles son los porcentajes de meiosis con ninguno, uno o dos entrecruzamientos?

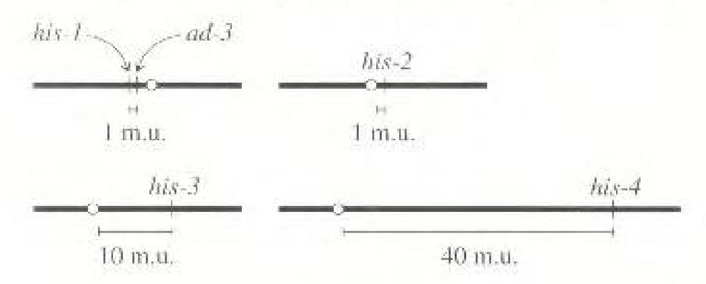
17. Cuenta con dos estirpes diferentes para realizar un experimento con una levadura haploide. Ambas crecen en medio mínimo enriquecido con arginina, pero ninguna lo hace en medio mínimo (el medio mínimo está compuesto por sales inorgánicas y un azúcar). Siguiendo el procedimiento adecuado, induce el apareamiento de las dos estirpes. Las células diploides sufren meiosis y forman tétradas desordenadas. Algunas de las ascosporas crecen en medio mínimo. Clasifica un gran número de tétradas para el fenotipo ARG^{-} (requerimiento de arginina) y ARG^{+} (crecimiento sin arginina) y obtiene los resultados siguientes:

Segregación de ARG^{-} : ARG^{+}	Frecuencias (%)
4:0	40
3:1	20
2:2	40

a. Utilizando sus propios símbolos, asigne un genotipo a cada una de las estirpes parentales. Para cada uno de los tres tipos de segregación, asigne genotipos a los segregantes.

b. Si hay más de un locus que gobierna el requerimiento de arginina, ¿están ligados?

18. En *Neurospora*, se conocen cuatro loci para la síntesis de histidina. Como aparece en el esquema, cada uno de los cuatro loci está situado en un cromosoma distinto:



En su experimento, comienza con una línea *ad-3*, a partir de la cual obtiene una cepa que también requiere histidina. Ahora, desea averiguar cuál de los cuatro loci de la histidina ha sido afectado. Cruza la cepa *ad-3 his*$^{-}$ con una cepa silvestre (*ad-3*$^{+}$ *his-1*$^{+}$; *his-2*$^{+}$; *his-3*$^{+}$; *his-4*$^{+}$) y analiza diez tétradas desordenadas: dos son DP, seis son T y otras dos son DNP. A partir de este resultado, ¿cuál de los cuatro loci *his* es más probable que sea el que cambió de *his*$^{+}$ a *his*$^{-}$?

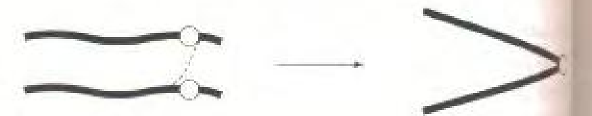
(Problema 18, cortesía de Lake deLange)

19. Las ascosporas del hongo ascomiceto haploide *Sordaria* son normalmente negras. Se han aislado dos variantes de color de las ascosporas (mutantes). Cuando se cruza el mutante 1 con el silvestre, las ascas que aparecen contienen cuatro esporas negras y cuatro esporas blancas; cuando se cruza el mutante 2 con el silvestre, las ascas que aparecen contienen cuatro esporas negras y cuatro esporas morenas. Cuando se cruzan entre sí los mutantes 1 y 2 algunas de las ascas contienen cuatro esporas negras y cuatro blancas, otras contienen cuatro esporas morenas y cuatro blancas, y otras contienen cuatro esporas blancas, dos negras y dos morenas. Explique estos resultados, indicando:

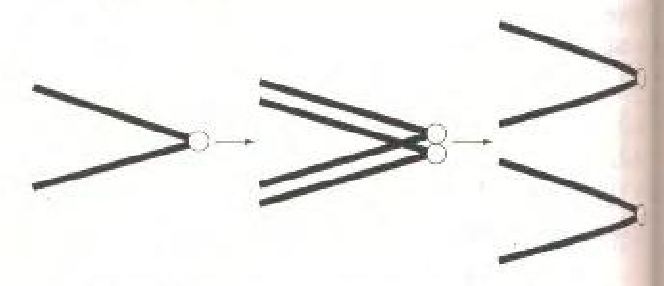
a. Los genotipos responsables de los tres fenotipos.

b. Una explicación de los tipos de ascas producidos en los cruzamientos de los mutantes, entre sí y con el silvestre.

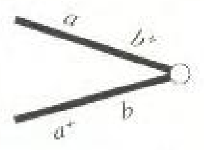
***20.** En *Drosophila melanogaster*, pueden unirse dos cromosomas X completos a un mismo centrómero:



Los dos brazos se comportan como un solo cromosoma denominado X unido. Averigüe cómo se heredan los cromosomas sexuales en cruzamientos entre hembras portadoras de cromosomas X unidos y machos normales. En la meiosis, un cromosoma X unido se duplica y segrega del siguiente modo:



Se puede producir intercambio de material genético entre cromátidas no hermanas de los cromosomas X unidos. Suponga que tiene un cromosoma X unido con el siguiente genotipo:



Haga un esquema con todos los productos genotípicos posibles y con sus fenotipos cuando se produce: **(a)** un solo entrecruzamiento entre *a* y *b*, y entre *b* y el centrómero, y **(b)** un doble entrecruzamiento entre *a* y *b*, y entre *b* y su centrómero. Asegúrese de tener en cuenta todas las posibilidades. ¿Podría considerarse esta situación un tipo de análisis de tétradas?

21. En *Neurospora*, el locus que determina el tipo sexual, que puede contener los alelos *a* ó *A*, está a 5 m.u. del centrómero, en el cromosoma 1, y el locus de resistencia a cicloheximida, que cuenta con los alelos *c* y *C*, está a 8 m.u. del centrómero, en el otro brazo del mismo cromosoma. ¿Qué proporción de tétradas *desordenadas* del cruzamiento *A C* × *a c* serán de cada uno de los siguientes tipos?

a.	**b.**	**c.**
A c	*A C*	*a C*
A C	*A C*	*a C*
a c	*a c*	*A c*
a C	*a c*	*A c*

22. Se realiza el siguiente cruzamiento con el hongo *Sordaria*

$$un \cdot cyh \times un^+ \cdot cyh^+$$

y se analizan 100 tétradas ordenadas. Éstas resultan ser de seis clases, que aparecen en las proporciones siguientes:

1	2	3
$un \cdot cyh$	$un \cdot cyh$	$un \cdot cyh$
$un^+ \cdot cyh$	$un \cdot cyh^+$	$un \cdot cyh$
$un \cdot cyh^+$	$un^+ \cdot cyh$	$un^+ \cdot cyh^+$
$un^+ \cdot cyh^+$	$un^+ \cdot cyh^+$	$un^+ \cdot cyh^+$
15	29	47

4	5	6
$un \cdot cyh$	$un \cdot cyh^+$	$un \cdot cyh$
$un^+ \cdot cyh^+$	$un^+ \cdot cyh$	$un^+ \cdot cyh^+$
$un \cdot cyh$	$un \cdot cyh^+$	$un \cdot cyh^+$
$un^+ \cdot cyh^+$	$un^+ \cdot cyh$	$un^+ \cdot cyh$
2	2	5

a. Calcule las distancias de mapa no corregidas entre los dos genes y entre cada uno de ellos y el centrómero.

b. Dibuje los seis esquemas de entrecruzamientos que explican el origen de cada clase.

c. ¿Qué tipo de tétradas faltan y por qué cree que es así?

d. ¿Por qué la clase 6 es más frecuente que las clases 4 y 5?

23. El cromosoma 4 de *Neurospora* contiene el locus *leu3* situado cerca del centrómero; sus alelos siempre segregan en la primera división meiótica. En el otro brazo del cromosoma 4, se encuentra el locus *cys2*, a una distancia del centrómero de 8 m.u. Si cruzamos una estirpe $leu3^-$ *cys2* con otra *leu3* $cys2^+$, e ignoramos los entrecruzamientos dobles y de mayor orden, ¿qué frecuencia esperaríamos de cada una de las siete clases de tétradas ordenadas que se indican (siendo $l = leu3$ y $c = cys2$)?

a.	**b.**	**c.**	**d.**
$l\ c$	$l\ c^+$	$l\ c$	$l\ c$
$l\ c$	$l\ c^+$	$l\ c^+$	$l^+\ c$
$l^+\ c^+$	$l^+\ c$	$l^+\ c^+$	$l^+\ c^+$
$l^+\ c^+$	$l^+\ c$	$l^+\ c$	$l\ c^+$

e.	**f.**	**g.**
$l\ c$	$l\ c^+$	$l\ c^+$
$l^+\ c^-$	$l^+\ c$	$l^+\ c$
$l^+\ c^+$	$l^+\ c$	$l^+\ c^+$
$l\ c$	$l\ c^+$	$l\ c$

24. Considere los siguientes alelos de *Drosophila*:
g determina cuerpo gris (negro en el silvestre)

c determina cerdas curvadas (erguidas en el silvestre)

s determina cuerpo granulado (liso en el silvestre)

Estos loci autosómicos se encuentran en el orden *g-c-s*-centrómero. Una estirpe homocigótica de cuerpo gris y granulado se cruza con otra estirpe homocigótica de cerdas curvadas. El aspecto fenotípico general de la F_1 es normalmente silvestre. Sin embargo, la observación de las moscas con el microscopio revela que en unos pocos individuos aparece uno de los tres patrones básicos siguientes:

a. Un sector gris y granulado junto a uno de cerdas curvadas.

b. Un sector gris junto a uno de cerdas curvadas.

c. Sectores grises aislados.

Ofrezca una hipótesis única que explique la aparición de los tres patrones.

25. Experimentos previos con el hongo *Aspergillus* han demostrado que los loci, *ad*, *col*, *phe*, *pu*, *sm* y *w* están todos en el mismo cromosoma, pero se desconoce en qué orden. Se obtiene un diploide con el siguiente genotipo: *ad col phe pu sm w*/ad^+ col^+ phe^+ pu^+ sm^+ w^+ (los genes están escritos en orden alfabético). Tras cultivar este diploide, se observan y aíslan algunos sectores diploides blancos (*w*/*w*). Estos sectores presentan los fenotipos siguientes (ninguno de los sectores diploides blancos expresa el alelo *col*):

ad phe pu sm	41 %
ad phe^+ *pu* sm^+	30 %
ad phe^+ *pu sm*	24 %
ad^+ phe^+ *pu* sm^+	5 %

a. ¿Cuál es el origen probable de estos sectores?

b. ¿Cuál es el orden relativo de los seis genes y el centrómero?

c. Indique las distancias de mapa en los casos en que sea posible.

d. ¿Por qué no se expresa el alelo *col* en las células diploides blancas?

26. En la soja, el alelo con dominancia incompleta *Y* hace que las hojas de los heterocigotos Y^+/Y sean de aspecto amarillento. Sin embargo, los heterocigotos muestran regularmente manchas raras de color verde junto a otras de color amarillo muy claro, ambas en el fondo de color amarillento. Proponga una explicación para la aparición de estas manchas raras.

27. Aísla sectores haploidizados blancos a partir de un diploide de *Aspergillus* de genotipo $w^-/w \cdot a^+/a \cdot b^+/b \cdot c^-/c$, y analiza su constitución respecto de los loci *a*, *b* y *c*. Descubre que un 25 % son $w \cdot a \cdot b \cdot c$, un 25 % son $w \cdot a^+ \cdot b^+ \cdot c^+$, un 25 % son $w \cdot a \cdot b^+ \cdot c$, y un 25 % son $w \cdot a^- \cdot b \cdot c^+$. ¿Qué relación de ligamiento puede establecer a partir de estas frecuencias? Resuma sus conclusiones.

28. Sabe que dos loci de *Aspergillus*, *y* y *ribo*, están ligados, pero desconoce su posición respecto al centrómero. Cuenta con un cultivo de un diploide de genotipo $y^+\ ribo^+/y\ ribo$, de color verde y que crece en ausencia de riboflavina. Observa algunos sectores amarillos en el cultivo y los analiza. Descubre que son diploides y que el 80 % de ellos crecen en ausencia de riboflavina, mientras que el 20 % restante necesita riboflavina para crecer. ¿Cuál es el orden más probable de los dos genes y el centrómero?

29. Un diploide de *Aspergillus* es de genotipo $pro^+/pro \cdot fpa^+/fpa \cdot paba^+/paba$; *pro* es un alelo recesivo que provoca requerimiento de prolina para crecer, *fpa* es un alelo recesivo que confiere resistencia a fluorofenilalanina y *paba* es un alelo recesivo que provoca requerimiento de ácido *para*-aminobenzoico (PABA). Cuando se siembran conidios en presencia de fluorofenilalanina, sólo crecen los que son resistentes a dicho compuesto. De 154 colonias *diploides* resistentes, 35 no requerían ni prolina ni PABA para crecer, 110 requerían PABA y 9 requerían ambos compuestos.

a. ¿Qué indican esas cifras?

b. Resuma sus conclusiones en un mapa.

c. Algunas colonias resistentes (no las descritas anteriormente) son haploides. ¿Cuál sería su predicción respecto a sus genotipos?

30. Se generó una estirpe diploide de *Aspergillus* mediante la fusión de estirpes haploides de genotipo $ad^+ \cdot leu^+ \cdot ribo^- \cdot fpa^+ \cdot w^+$ y $ad \cdot leu \cdot ribo \cdot fpa \cdot w$. Los alelos mutantes son todos recesivos y determinan el requerimiento de adenina, leucina y riboflavina; resistencia a fluorofenialanina, y esporas asexuales blancas, respectivamente. Cuando se sembraron miles de esporas asexuales de la estirpe diploide en medio que contenía fluorofenialanina, adenina, leucina y riboflavina, sólo crecieron 93 colonias, que se analizaron en detalle.

a. Se determinó que 38 colonias eran haploides. De éstas, 22 eran de genotipo $fpa \cdot leu \cdot ribo \cdot ad^+ \cdot w^+$ y 16 de genotipo $fpa \cdot leu \cdot ribo \cdot ad \cdot w$. ¿Qué nos dice este resultado sobre el ligamiento de los genes? Resúmalo en un esquema.

b. Las 55 colonias restantes eran diploides. De éstas, 24 no requerían ni leucina ni riboflavina, 17 requerían riboflavina pero no leucina y 14 requerían ambas. ¿Qué información adicional sobre el ligamiento aporta este resultado? Resúmalo en un esquema.

31. Se analizaron siete híbridos celulares hombre-ratón irradiad[os] para la presencia de seis marcadores moleculares diferent[es] (A a F) del genoma humano. Los resultados se muestran en la tabla siguiente, donde «+» significa presencia del marcad[or]

	HÍBRIDOS DE RADIACIÓN						
Parejas	1	2	3	4	5	6	7
A	–	+	–	–	+	+	–
B	+	–	+	–	–	–	–
C	+	–	+	+	–	+	–
D	–	+	–	+	+	+	–
E	+	–	–	+	+	–	+
F	+	–	–	+	+	–	+

a. ¿Qué relaciones de ligamiento entre los marcadores [se] deducen de estos resultados?

b. ¿Hay alguna evidencia de que los marcadores estén [en] cromosomas distintos?

32. Un investigador consigue mantener tres colonias de célu[-] las híbridas hombre-ratón. Los únicos cromosomas huma[-] nos que se mantienen en esas células híbridas son los que se indican con el signo + en la tabla siguiente:

Colonia híbrida	CROMOSOMA HUMANO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	+	+	+	+	–	–	–	–
B	+	+	–	–	+	+	–	–
C	+	–	+	–	+	–	+	–

El investigador comprueba la presencia de cinco enzim[as] (α, β, γ, δ y ε) en cada una de las colonias y obtiene los siguientes resultados: sólo hay actividad α en la colonia C, la actividad β está presente en las tres colonias, la actividad γ sólo en las colonias B y C, δ sólo en la colonia B, y [ε] no se detecta en ninguna de las colonias. ¿Qué puede de[cir] el genetista sobre la localización de los genes responsabl[es] de cada una de estas actividades enzimáticas?

33. Considere el siguiente conjunto de líneas celulares híbri[-] das hombre-ratón:

Línea celular	CROMOSOMA HUMANO							
	1	2	6	9	12	13	17	21	X
A	+	+	–	q	–	p	+	+	+
B	+	–	p	+	–	+	+	–	–
C	–	+	+	+	p	–	+	–	+
D	+	+	–	+	+	–	q	–	+
E	p	–	+	–	q	–	+	+	q
F	–	p	–	–	q	–	+	+	p
G	q	+	–	+	+	+	+	–	–
H	+	q	+	–	–	q	+	–	+

Cada línea celular puede ser portadora de un cromosom[a] (números) intacto (+), de sólo su brazo largo (q), de sólo [su] brazo corto (p), o puede carecer del cromosoma (–).

Se estudió la presencia (+) o ausencia (–) de las siguien[-] tes enzimas humanas en las líneas celulares A-H:

	LÍNEA CELULAR							
Enzima	A	B	C	D	E	F	G	H
Sulfatasa esteroidea	+	−	+	+	−	+	−	+
Fosfoglucomutasa-3	−	−	+	−	+	−	−	+
Esterasa D	−	+	−	−	−	−	+	+
Fosfofructoquinasa	+	−	−	−	+	+	−	−
Amilasa	+	+	−	+	+	−	−	+
Galactoquinasa	+	+	+	+	+	+	+	+

Identifique el cromosoma portador de cada locus enzimático. Cuando sea posible, identifique el brazo cromosómico. (El problema 33 se ha obtenido de L. A. Snyder, D. Freifelder y D. L. Hartl, *General Genetics*, Jones y Bartlett, 1985.)

34. Imagine que inicia un estudio en el que quiere cartografiar parte del cromosoma 17 humano mediante hibridación de células humanas y de ratón. Tres loci —*a*, *b* y *c*— de este cromosoma están implicados en la producción de los compuestos a, b y c, que son esenciales para el crecimiento y están presentes tanto en ratones como en humanos. En su estudio fusiona células de ratón, que son fenotípicamente $a^- b^- c^-$, con células humanas $a^+ b^+ c^+$. Supongamos que encuentra un híbrido en el que el único componente humano es el brazo derecho del cromosoma 17 (17R) translocado, por algún mecanismo desconocido, a un cromosoma de ratón. El híbrido puede fabricar los compuestos a, b y c. A continuación, las células se tratan con adenovirus que provocan roturas en los cromosomas. Suponga que aísla 200 líneas en las que se han perdido pequeñas partes del brazo 17R translocado. Analiza la capacidad de estas líneas para producir a, b y c, y obtiene el resultado siguiente:

Número	Produce
0	Sólo a
0	Sólo b
12	Sólo c
0	Sólo a y b
80	Sólo b y c
0	Sólo a y c
60	a, b y c
48	Nada

a. ¿Cómo se originan los distintos tipos?

b. ¿Están *a*, *b* y *c* en el brazo derecho del cromosoma 17? En caso afirmativo, dibuje un mapa indicando sus posiciones relativas.

c. ¿Cómo le ayudaría en su análisis el patrón de bandas de los cromosomas?

35. En *Neurospora*, los alelos mutantes *thr* y *met* producen un requerimiento de treonina y metionina, respectivamente. Los dos genes se sitúan muy próximos, en el brazo derecho del cromosoma 4, a 8 unidades de mapa del centrómero. El locus *thr* es el más próximo al centrómero. Sin embargo, casi nunca se han observado entrecruzamientos entre los loci *thr* y *met*. Asumiendo que no ocurren entrecruzamientos entre *thr* y *met*, ¿qué proporción de tétradas lineales ordenadas en un cruzamiento de silvestre × *thr met* serán (se escribe en primer lugar el patrón M del locus *thr*):

a. DP M_I M_I?

b. DNP M_I M_I?

c. T M_I M_{II}?

d. T M_{II} M_I?

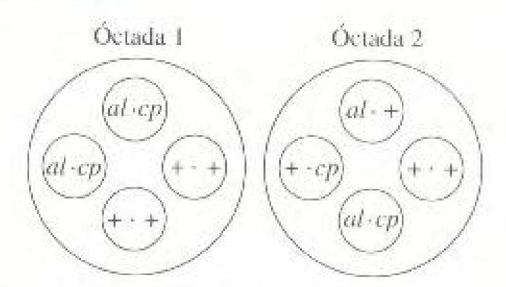
e. DP M_{II} M_{II}?

f. DNP M_{II} M_{II}?

g. T M_{II} M_{II}?

¿Qué proporción de ascosporas escogidas al azar formarán colonias en medio mínimo?

36. *Gelasinospora* es un hongo que produce tétradas desordenadas. Se realizó un cruzamiento entre dos mutantes de *Gelasinospora*, uno que era *al* (células albinas en lugar del color naranja normal) y el otro que era *cp* (colonias compactas en lugar del crecimiento extendido normal). Se aislaron al azar dos tétradas desordenadas. Contenían los genotipos siguientes:



Dibuje un esquema de la meiosis que ilustre claramente cómo se han originado estas dos óctadas, teniendo en cuenta las hipótesis alternativas siguientes:

a. Los dos loci están ligados.

b. Los dos loci están en cromosomas distintos.

Como las óctadas se eligieron al azar, ¿podrían usarse sus genotipos para determinar cuál de las dos hipótesis es más probable? Explique su respuesta.

37. En *Drosophila*, los genes para el cuerpo ébano (*e*) y cerdas achaparradas (*s*) están ligados en el mismo brazo del cromosoma 2. Las moscas de genotipo + *s*/*e* + se desarrollan generalmente como silvestres, pero ocasionalmente muestran en su cuerpo dos tipos distintos de anormalidades. La primera anormalidad es parejas de parches adyacentes, uno con cerdas achaparradas y el otro con cuerpo ébano. La segunda anormalidad es parches aislados de color ébano.

a. Dibuje esquemas para mostrar los orígenes probables de estos dos tipos de anormalidades.

b. Explique por qué no hay parches aislados con cerdas achaparradas.

7

TRANSFERENCIA GÉNICA EN BACTERIAS Y SUS VIRUS



Colonias bacterianas en un medio de tinción.
Las células Lac^- son blancas. Las colonias Lac^+ se tiñen de rojo.
(Jeffrey H. Miller.)

Ideas fundamentales

El factor de fertilidad (F) permite la transferencia de DNA de una célula bacteriana a otra mediante el proceso de conjugación.

El factor F puede hallarse libre en el citoplasma o integrado en el cromosoma bacteriano.

Si F se integra en el cromosoma, pueden transferirse marcadores cromosómicos durante la conjugación.

Los bacteriófagos también pueden transferir DNA de una célula bacteriana a otra.

El proceso de transducción generalizada consiste en la incorporación aleatoria de fragmentos cromosómicos en la cápside de ciertos fagos bacterianos y su transferencia a otras células mediante infección.

Durante la transducción especializada, se produce la incorporación accidental en el genoma del fago de genes específicos de la bacteria cercanos a su sitio de integración y su transferencia a otras células por infección.

Los diferentes métodos de transferencia génica existentes en bacterias permiten a los genetistas elaborar mapas detallados de los genes bacterianos.

Hasta ahora, nos hemos ocupado casi exclusivamente de los genes empaquetados en cromosomas localizados en el interior del núcleo de organismos eucarióticos. Sin embargo, gran parte de la historia de la Genética y del análisis genético actual (en particular, la Genética molecular) está relacionada con organismos procarióticos, que no presentan un núcleo diferenciado, y con los virus. Aunque los **virus** comparten con los organismos vivos algunas de sus propiedades características, muchos biólogos consideran a los virus entidades diferentes que en ciertos sentidos no se parecen a los seres vivos. No son células; no pueden crecer o multiplicarse por sí mismos. Para reproducirse, han de parasitar a células vivas y utilizar su maquinaria metabólica. No obstante, los virus tienen propiedades hereditarias que pueden someterse a análisis genético. El análisis genético de las bacterias y sus virus ha constituido una fuente de descubrimientos que han sido esenciales para comprender la naturaleza y la estructura del material genético, del código genético y de la mutación.

Los **procariotas** son las bacterias y las algas verdeazuladas, ahora clasificadas como *cianobacterias*. Los virus que parasitan a las bacterias se denominan **bacteriófagos** o, simplemente, **fagos**. Los trabajos pioneros realizados con bacteriófagos han aportado mucha de la información actual sobre virus causantes de tumores y otros virus de animales y plantas.

En comparación con los eucariotas, los organismos procarióticos y los virus presentan cromosomas muy sencillos que no están localizados en un compartimiento delineado por la membrana nuclear. Debido a que son monoploides, estos cromosomas no sufren meiosis; aunque pasan por etapas análogas a la meiosis. El enfoque del análisis genético de la recombinación en estos organismos es sorprendentemente similar a la utilizada en eucariotas.

Como trataremos en detalle en este capítulo, existen varios mecanismos diferentes que permiten a las bacterias recombinar. En el primer proceso que estudiaremos, la **conjugación**, una célula bacteriana transfiere fragmentos de DNA a otra mediante contacto directo entre las células. Asimismo, una célula bacteriana puede tomar un fragmento de DNA del medio ambiente e incorporarlo a su propio cromosoma, proceso denominado **transformación**. Además, ciertos virus bacterianos toman ocasionalmente un fragmento de DNA de una bacteria y lo inyectan en otra, que puede incorporarlo en su cromosoma, mediante un proceso conocido como **transducción**.

Aspectos prácticos del trabajo con microorganismos

Las bacterias pueden cultivarse en medio líquido o en una superficie sólida, como el gel de agar, siempre que el medio contenga los ingredientes nutritivos básicos. En un medio líquido, las bacterias se dividen por fisión binaria: se multiplican geométricamente hasta que los nutrientes se agotan en el medio o hasta que se acumulan productos residuales tóxicos que detienen el crecimiento de la población. Con una pipeta, se puede inocular una pequeña cantidad de cultivo líquido en crecimiento en una placa de Petri que contenga medio con agar, y extenderla sobre la superficie con un asa de siembra estéril. Este proceso se conoce como **siembra en placa** (Fig. 7-1). Cada célula se divide entonces por fisión binaria. Debido a que las células están inmovilizadas en el agar, todas las células hijas permanecen juntas en un grupo. Cuando esta masa celular alcanza más de 10^7 células, se hace visible a simple vista como una **colonia**. Si la muestra sembrada inicialmente contiene muy pocas células, cada colonia individual de la placa procederá de una única célula original. Los miembros de una colonia que derivan de un solo antepasado genético común constituyen un **clon**.



Figura 7-1. Métodos para el cultivo de bacterias en el laboratorio. Unas pocas células bacterianas que han estado creciendo en un medio líquido [...] nutrientes se extienden sobre un medio con agar que contiene también los nutrientes necesarios. Cada una de estas células originales se divide repetidamente por fisión binaria, dando lugar a una colonia. Todas las células de una colonia, procedentes de una misma célula, tendrán el mismo genotipo y fenotipo.

Las bacterias silvestres son **protótrofas**: pueden formar colonias en **medio mínimo** (un sustrato que sólo contiene sales inorgánicas, una fuente de carbono y energía, y agua). Los clon[...]

CUADRO 7-1. Algunos símbolos genotípicos utilizados en genética bacteriana

Símbolo	Carácter o fenotipo asociado al símbolo
bio^-	Requiere suplemento de biotina en el medio mínimo
arg^-	Requiere suplemento de arginina en el medio mínimo
met^-	Requiere suplemento de metionina en el medio mínimo
lac^-	Incapaz de utilizar lactosa como fuente de carbono
gal^-	Incapaz de utilizar galactosa como fuente de carbono
str^r	Resistente al antibiótico estreptomicina.
str^s	Sensible al antibiótico estreptomicina.

Nota: el medio mínimo es el medio sintético básico para el crecimiento bacteriano [...] nutrientes suplementarios.

mutantes se identifican porque son **auxótrofos**: no crecerán a menos que el medio contenga uno o más nutrientes específicos (por ejemplo: adenina, o treonina y biotina). Además, las estirpes silvestres son sensibles a ciertos inhibidores del crecimiento, como la estreptomicina, mientras que los **mutantes resistentes** forman colonias aunque esté presente el inhibidor. Estas propiedades permiten a los genetistas distinguir diferentes fenotipos entre las colonias sembradas.

Para muchos caracteres, el fenotipo de un clon se determina fácilmente mediante reconocimiento visual o pruebas químicas sencillas. El fenotipo de una colonia se corresponde entonces con el de la célula original que dio lugar al clon, determinándose así las frecuencias de los diferentes fenotipos en la muestra sembrada. El Cuadro 7-1 incluye algunos fenotipos bacterianos y sus símbolos genéticos.

Conjugación bacteriana

En este apartado y en los siguientes se describe el descubrimiento de la transferencia de genes entre bacterias, y se explican los diferentes tipos de transferencia y su empleo en la Genética bacteriana. En primer lugar consideraremos la conjugación, que requiere un contacto directo entre las células. La conjugación fue el primer método de transferencia génica estudiado en detalle.

El descubrimiento de la conjugación

¿Poseen las bacterias algún proceso similar a la reproducción sexual y la recombinación? Esta pregunta fue respondida en 1946, gracias al sencillo y elegante trabajo experimental de Joshua Lederberg y Edward Tatum, quienes estudiaban dos estirpes de *Escherichia coli* con requerimientos nutritivos distintos. La estirpe A crecía en medio mínimo sólo si se añadía metionina y biotina; la estirpe B crecía en medio mínimo sólo si se añadía treonina, leucina y tiamina. Así que la estirpe A puede representarse como *met⁻ bio⁻ thr⁺ leu⁺ thi⁺* y la estirpe B como *met⁺ bio⁺ thr⁻ leu⁻ thi⁻*. La Figura 7-2*a* explica de forma simplificada la idea del experimento. En este caso, las estirpes A y B se mezclan, y algunos de los descendientes se muestran ahora silvestres, pues han recuperado la capacidad de crecer sin la adición de suplementos. La Figura 7-2*b* ilustra el experimento con más detalle.

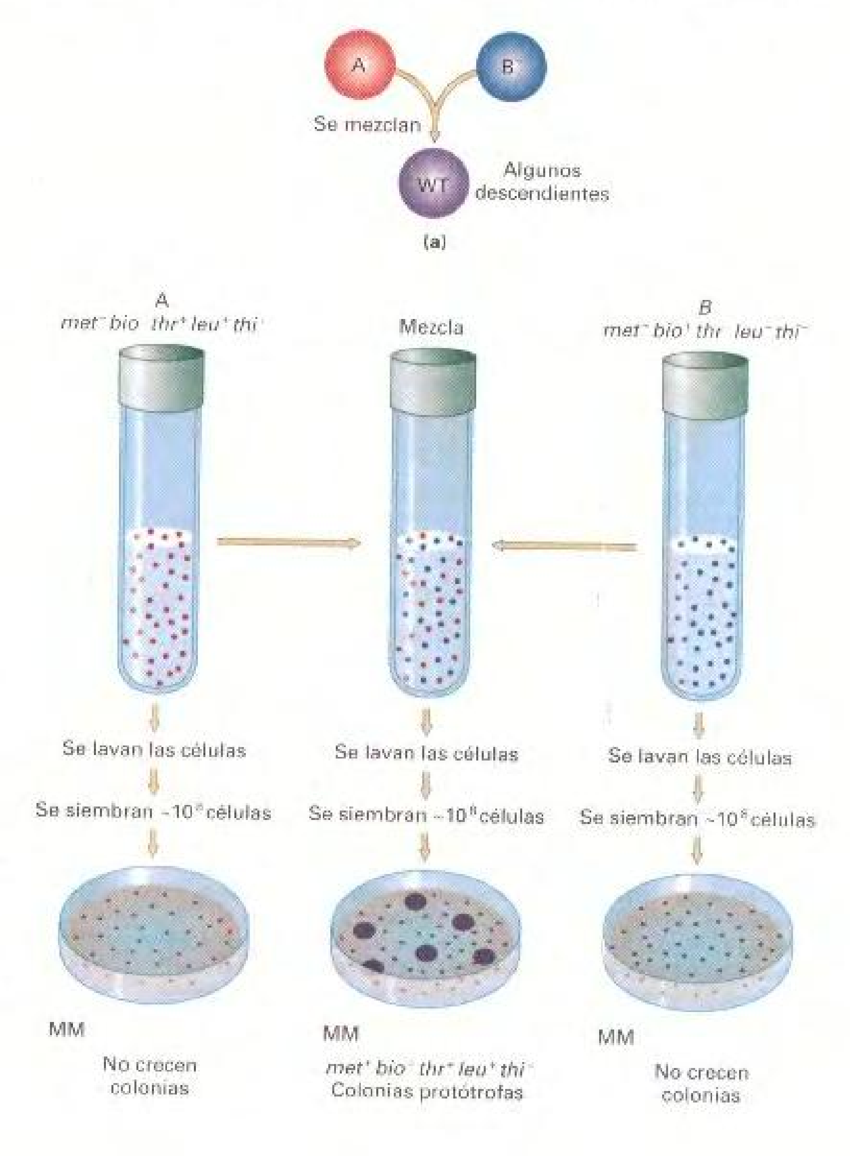


Figura 7-2. Demostración de Lederberg y Tatum de la recombinación genética entre células bacterianas. Las células del tipo A o del tipo B no pueden crecer en un medio mínimo (MM) sin suplementos, puesto que A y B llevan mutaciones que provocan la incapacidad de sintetizar los constituyentes necesarios para el crecimiento celular. Sin embargo, si se mezclan las células A con las B durante unas horas y luego se siembran en una placa, aparecen unas pocas colonias en la placa de agar. Cada una de estas colonias deriva de una sola célula en la cual ha habido un intercambio de material genético; por tanto, son capaces de sintetizar todos los constituyentes necesarios del metabolismo.

Lederberg y Tatum sembraron bacterias en placas que contenían medio mínimo sin suplementos. Algunas placas se sembraron sólo con bacterias de la estirpe A, otras sólo con bacterias de la estirpe B, y otras con una mezcla de bacterias de las estirpes A y B que se habían incubado conjuntamente durante varias horas en un medio líquido que contenía todos los suplementos. En las placas donde se sembró sólo la estirpe A o sólo la estirpe B no aparecieron colonias, demostrando que la restauración de la prototrofía (la capacidad de crecer en medio mínimo sin suplementos) no se había producido por mutaciones revertientes. Sin embargo, en las placas que contenían la mezcla de las dos estirpes aparecieron colonias con una frecuencia de 1 cada 10 000 000 de células sembradas (en notación científica, 1×10^{-7}). Esta observación sugería que había ocurrido algún tipo de recombinación entre los genomas de las dos estirpes que había dado lugar a individuos protótrofos.

Necesidad de contacto físico entre las células

Podría pensarse que las células de dos estirpes no intercambian en realidad genes, sino que liberan sustancias que las otras células pueden absorber y utilizar para crecer. Esta posibilidad de «alimentación cruzada» fue descartada por Bernard Davis. Construyó un tubo con forma de «U» en el cual los dos brazos de la U estaban separados por un filtro de tamaño de poro pequeño. Los poros del filtro eran demasiado pequeños para permitir el paso de bacterias, pero suficientemente grandes para permitir el trasvase de medio líquido y de las sustancias disueltas en él (Fig. 7-3). Colocó la estirpe A en un brazo y la estirpe B en el otro. Después de incubar las estirpes durante un tiempo, analizó el contenido de cada brazo para averiguar si habían aparecido células capaces de crecer en el medio mínimo y no encontró ninguna. En otras palabras, el *contacto físico* entre las dos estirpes era imposible para que se obtuvieran células silvestres. Parecía que se estaba produciendo algún tipo de transferencia génica y que se estaban obteniendo recombinantes genéticos reales.

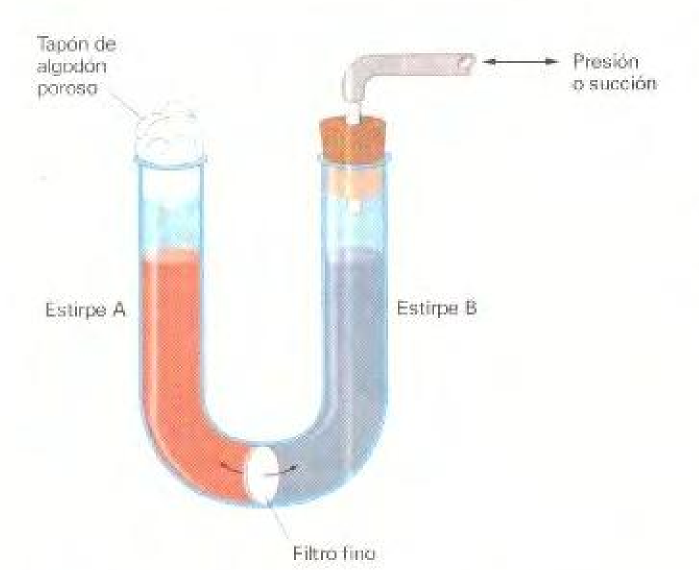


Figura 7-3. Experimento que demuestra la necesidad de contacto físico entre las células bacterianas para que tenga lugar la recombinación genética. Una suspensión de una estirpe bacteriana incapaz de sintetizar ciertos nutrientes se coloca en uno de los brazos del tubo con forma de U. Otra estirpe incapaz genéticamente de sintetizar distintos metabolitos necesarios se coloca en el otro brazo. El líquido se transfiere entre los brazos mediante la aplicación de presión o succión, pero las células no pasan a través del filtro central. Tras varias horas de incubación, se siembran las células, pero no crecen colonias en el medio mínimo.

El descubrimiento del factor de fertilidad (F)

En 1953, William Hayes determinó que la transferencia genética ocurría en una sola dirección en los tipos de cruzamientos que se realizaba. Por tanto, la transferencia de material genético en *E. coli* no es recíproca. Una célula actúa como donante y la otra célula como receptora. Al principio, este tipo de transferencia unidireccional de genes se equiparó a la existencia de diferencias sexuales, denominando «macho» al donante y «hembra» a la receptora. No obstante, este tipo de transferencia génica no es una verdadera reproducción sexual. En el caso de la **transferencia genética bacteriana**, un organismo recibe información genética de una célula **donante**, y la célula **receptora** cambia en función de la información recibida. En el caso de la **reproducción sexual**, los dos organismos donantes participan igualmente (o casi igualmente) en la formación de un organismo nuevo y sólo en casos excepcionales cualquiera de los donantes experimenta algún cambio.

COROLARIO

La transferencia de material genético en *E. coli* no es recíproca. Una de las dos células actúa como donante y la otra como receptora.

Pérdida y recuperación de la capacidad de transferir. Hayes descubrió casualmente una variante de su estirpe donante original que cuando se cruzaba con la estirpe receptora no producía recombinantes. Aparentemente, las células del tipo donante habían perdido la capacidad de transferir material genético y se habían convertido en células de tipo receptor. Al analizar esta variante donante «estéril», Hayes se dio cuenta de que *E. coli* podía perder y recuperar su fertilidad (capacidad de actuar como donante) con relativa facilidad. Hayes sugirió que la capacidad para actuar como donante era una propiedad hereditaria conferida por el **factor de fertilidad (F)**. Las estirpes portadoras de F son capaces de do-

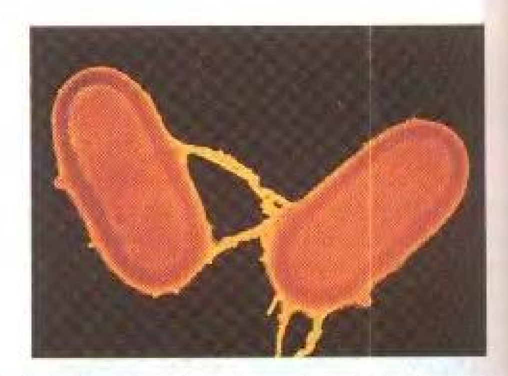


Figura 7-4. Las bacterias transfieren plásmidos (círculos de DNA) mediante conjugación. Una célula donante extiende una o más proyecciones que se adhieren a la célula receptora y la atraen para unirse a ella. (Oliver Meckes/MPI-Tübingen, Photo Researches.)

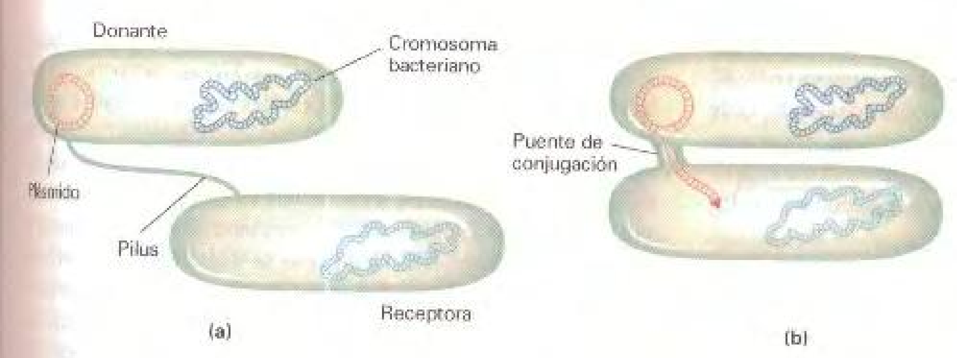


Figura 7-5. (a) Un pilus une a las dos bacterias durante la conjugación. (b) Después se forma un puente (básicamente un poro) entre las dos células. A continuación, una cadena de DNA del plásmido pasa a la bacteria receptora, y a partir de cada cadena sencilla se forma una doble.

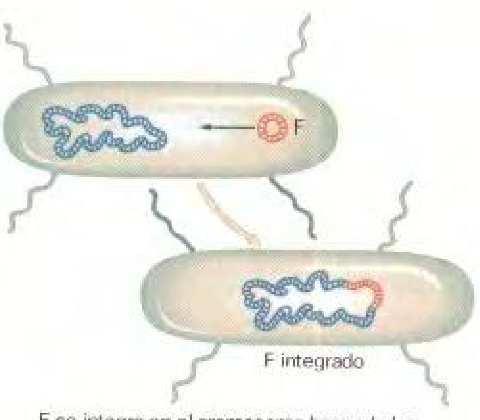
dores y se designan **F⁺**. Las estirpes carentes de F no pueden donar dores, siendo las receptoras. Tales estirpes se designan **F⁻**.

Transferencia del factor F durante la conjugación. Hayes observó que los genotipos recombinantes para los genes marcadores aparecían con una frecuencia relativamente baja en los cruzamientos bacterianos, si bien el factor F parecía transmitirse muy eficazmente durante el contacto físico o **conjugación**. Parecía haber algún tipo de «transferencia infecciosa» del factor F. Ahora sabemos mucho más sobre el proceso de conjugación y sobre el factor F, que es un tipo de plásmido que se puede replicar en el citoplasma de modo independiente del cromosoma hospedador. Las Figuras 7-4 y 7-5 muestran cómo las bacterias transfieren plásmidos del tipo del factor F. El plásmido F dirige la síntesis de pili, unas proyecciones que inician el contacto con la célula receptora (Fig. 7-4), adhiriéndose a ella y permitiendo al DNA de F pasar a la célula receptora a través de un poro. Se transfiere una de las cadenas de DNA de F y luego la replicación del DNA restaura la cadena complementaria tanto en el donante como en el receptor. Esta replicación tiene como resultado que permanezca una copia de F en el donante y aparezca otra en el receptor, como muestra la Figura 7-5.

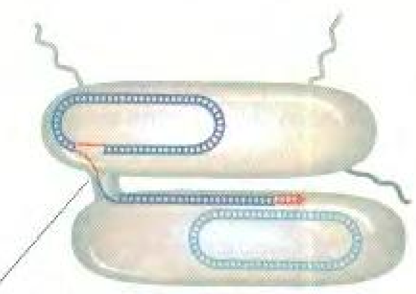
Las estirpes Hfr

Las investigaciones dieron un giro muy importante cuando Luca Cavalli-Sforza obtuvo una nueva clase de células a partir de una estirpe F⁺. Al cruzarla con células F⁻, esta nueva estirpe producía recombinantes para marcadores genéticos con una frecuencia 1000 veces superior a la observada en una estirpe F⁺ normal. Cavalli-Sforza la denominó estirpe Hfr (del inglés, *high frequency of recombination*) para indicar una alta frecuencia de recombinación. En los cruzamientos Hfr × F⁻, prácticamente ninguno de los parentales F⁻ se convertía en F⁺ o en Hfr. Esto contrasta con los cruzamientos F⁺ × F⁻, en los cuales una gran proporción de parentales F⁻ se convierten en F⁺ por la transferencia del factor F. La Figura 7-6 ilustra este concepto. Resultó aparente que una estirpe Hfr es el resultado de la integración del factor F en el cromosoma, como indica la Figura 7-6*a*.

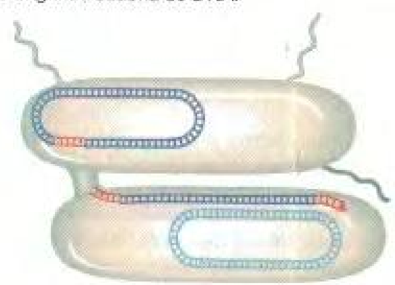
Ahora bien, durante la conjugación entre una célula Hfr y una F⁻, una parte del cromosoma de la Hfr se transfiere junto con F. La rotura aleatoria del fragmento cromosómico interrumpe la transferencia antes de que se haya transferido el cromosoma completo. El fragmento cromosómico transferido puede entonces recombinar con el cromosoma de la célula receptora. Claramente,



F se integra en el cromosoma hospedador
(a)



Se transfiere una sola cadena de F, junto con una copia de parte del cromosoma hospedador, a una célula receptora, en la cual se sintetiza la segunda cadena de DNA.



Una copia del cromosoma hospedador con F integrado (generada por replicación) permanece en la célula donante tras la replicación de la otra cadena sencilla.
(b)

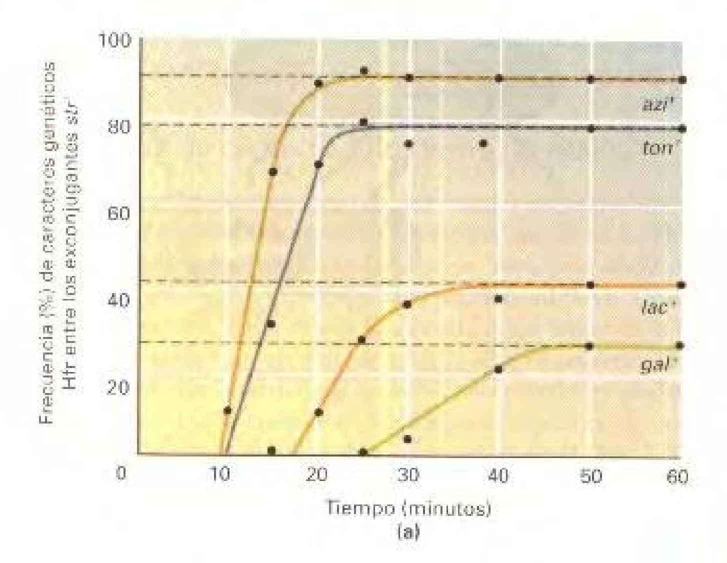
Figura 7-6. Transferencia de marcadores cromosómicos de *E. coli* mediada por F. (a) En ocasiones, el factor F libre se integra en el cromosoma de *E. coli*. (b) Cuando el factor F integrado se transfiere a otra célula de *E. coli* durante la conjugación, se lleva junto a él cualquier segmento de DNA de *E. coli* adyacente, transfiriendo así marcadores cromosómicos del hospedador a una nueva célula.

el bajo nivel de transferencia de marcadores genéticos observado por Lederberg y Tatum (véase Fig. 7-2) en el cruzamiento $F^+ \times F^-$ se puede explicar por la presencia de unas pocas células Hfr en la población. Cuando estas células se aíslan y purifican, como hizo Cavalli por primera vez, se transfieren entonces marcadores cromosómicos con alta frecuencia, debido a que todas las células son Hfr.

Determinación del ligamiento mediante conjugación interrumpida

La naturaleza exacta de las estirpes Hfr quedó establecida en el año 1957, cuando Elie Wollman y François Jacob estudiaban el patrón de transmisión de genes de células Hfr a células F^- durante un cruzamiento. Cruzaron una estirpe Hfr $str^s\ a^+\ b^+\ c^+\ d^+$ con una estirpe F^- $str^r\ a^-\ b^-\ c^-\ d^-$. Después de mezclarlas, tomaron muestras a intervalos específicos de tiempo. Pusieron cada una de las muestras en una batidora de cocina durante unos pocos segundos para separar las parejas de células en conjugación y las sembraron en un medio que contenía estreptomicina para eliminar a las células donantes Hfr. El proceso se llama **conjugación interrumpida**. A continuación, analizaron la presencia de marcadores del donante en las células str^r. Aquellas células str^r portadoras de marcadores del donante han debido participar en el proceso de conjugación y se denominan **exconjugantes**. La Figura 7-7*a* muestra una gráfica de los resultados: azi^r, ton^r, lac^+ y gal^+ corresponden a $a^+\ b^+\ c^+$ y d^+ en nuestra descripción general del experimento. La Figura 7-7*b* ilustra la transferencia de los marcadores.

Lo más sorprendente de estos resultados es que cada uno de los alelos del donante apareció por primera vez en los receptores F^- en un momento concreto tras el comienzo de la conjugación y en un orden característico. Además, el porcentaje máximo de células portadoras de un alelo donante determinado era menor para aquellos marcadores del donante que entraban más tarde. Teniendo en cuenta todas estas observaciones, Wollman y Jacob concluyeron que la transferencia de los genes comienza en un punto fijo del cromosoma donante, denominado **origen (O)**, y continúa de manera lineal.



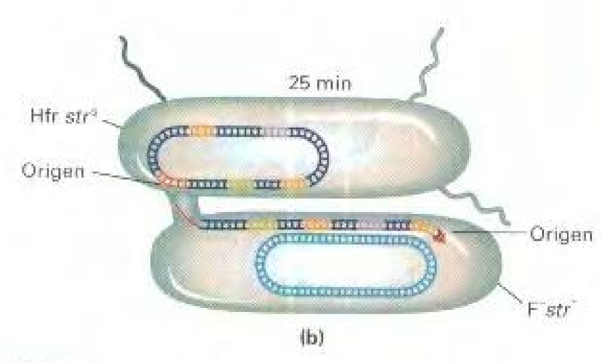


Figura 7-7. Experimentos de conjugación interrumpida con *E. coli*. Se cruzan células F^- str^r con células Hfr str^s. Las células F^- tienen una serie de mutaciones (indicadas por los marcadores genéticos *azi, ton, lac* y *gal*) que les impiden llevar a cabo determinadas reacciones metabólicas. Por el contrario, las células Hfr son capaces de realizar todas estas reacciones. Tras la mezcla de los dos tipos de células, se recogen muestras a distintos tiempos, se disgregan las células en una batidora, para interrumpir la conjugación entre ellas, y se siembran en un medio con estreptomicina. El antibiótico elimina las células Hfr, pero permite el crecimiento de las células F^-, que son analizadas para comprobar si son capaces de llevar a cabo los cuatro pasos metabólicos. (a) Gráfica que muestra la frecuencia de recombinantes para cada marcador metabólico con respecto al tiempo transcurrido de apareamiento antes de la interrupción. La transferencia del alelo donante para cada paso metabólico depende del tiempo que se deja transcurrir la conjugación. (b) Representación esquemática de la transferencia de marcadores a lo largo del tiempo (Parte a modificada de E. L. Wollman, F. Jacob y W. Hayes, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 21, 1956, 141.)

COROLARIO

El cromosoma de la estirpe Hfr, que originalmente es circular, se desenrolla y se transfiere a la célula F^- de modo lineal. La apertura del cromosoma y su transferencia comienzan en un punto concreto situado en un extremo del factor F integrado, denominado origen (O). Cuanto mayor es la distancia entre un gen y O, más tarde se transfiere a la célula F^-; es muy probable que el proceso de transferencia cromosómica se interrumpa antes de que se transfieran los genes más alejados.

Wollman y Jacob se dieron cuenta de que sería fácil construir mapas de ligamiento a partir de los experimentos de conjugación interrumpida utilizando como medida de «distancia» el tiempo que tarda en entrar un alelo del donante después de que se haya iniciado la conjugación. La unidad de distancia en este caso es el minuto. De modo que, si un alelo donante b^+ entra en la célula F^- 10 minutos después que a^+, entonces a^+ y b^+ están separados por 10 unidades (Fig. 7-8). Como en el caso de los mapas basados en frecuencias de recombinación, estos mapas de ligamiento son puramente interpretaciones genéticas, pues en aquellos tiempos no se conocía la base física del proceso.



Figura 7-8. Mapa cromosómico basado en los datos de la Figura 7-7. Puede construirse un mapa de ligamiento del cromosoma de *E. coli* a partir de experimentos de conjugación interrumpida, utilizando el tiempo en que empieza a aparecer cada alelo donante tras el inicio de la conjugación. La unidad de distancia es el minuto. La flecha hacia la izquierda indica la dirección de la transferencia de los alelos del donante.

Circularidad del cromosoma e integración de F

Cuando Wollman y Jacob permitieron que los cruzamientos Hfr × F⁻ prosiguieran durante dos horas antes de tratar con la batidora, encontraron que algunos de los exconjugantes se convertían en Hfr. En otras palabras, una parte importante de F (la parte del extremo que ahora sabemos que confiere la «masculinidad» o capacidad de actuar como donante) se transmite con el tiempo, aunque con una eficacia muy baja y, aparentemente, como último elemento del «cromosoma» lineal. Ahora, tenemos el mapa siguiente, en el que la flecha indica el proceso de transferencia, que empieza en O:



Sin embargo, cuando se construyeron mapas de ligamiento por conjugación interrumpida y análisis de los tiempos de entrada a partir de estirpes Hfr aisladas independientemente, se observaron diferencias de una estirpe a otra.

Estirpe Hfr	
H	O *thr pro lac pur gal his gly thi* F
1	O *thr thi gly his gal pur lac pro* F
2	O *pro thr thi gly his gal pur lac* F
3	O *pur lac pro thr thi gly his gal* F
AB 312	O *thi thr pro lac pur gal his gly* F

A simple vista, parece haber una reorganización al azar de los genes. Sin embargo, existe un patrón; los genes no ocupan posiciones aleatorias en cada estirpe. Por ejemplo, observe que en todos los casos el gen *his* está situado entre *gal* y *gly*. Esto es aplicable a cualquiera de los genes, a menos que aparezca en uno de los extremos del mapa de ligamiento. El orden de transferencia de los marcadores no es constante. En dos estirpes Hfr, por ejemplo, el gen *his* se transfiere antes que el gen *gly* (*his* está más próximo a O), pero en tres de las estirpes, el gen *gly* se transfiere antes que *his*.

¿Cómo podemos explicar estos resultados? Allan Campbell propuso una hipótesis sorprendente para la época: supongamos que en una bacteria masculina F^+, el factor F es un elemento citoplásmtico pequeño (y, por tanto, se transfiere fácilmente a una célula F^- durante la conjugación). Si el *cromosoma* de la bacteria F^+ fuera *circular*, cualquiera de los cromosomas lineales Hfr podrían generarse simplemente por inserción de F en el círculo, en la posición y la orientación adecuadas (Fig. 7-9).

De esta hipótesis se derivan varias conclusiones (confirmadas posteriormente)

1. La orientación en la que se integra F determina la polaridad del cromosoma Hfr, como se indica en la Figura 7-9*a*.
2. Un extremo del factor F integrado es el **origen**, donde comienza la transferencia del cromosoma Hfr; **el término**, en el otro extremo de F, no se transfiere, a menos que todo el cromosoma lo hubiera hecho antes. Como el cromosoma se rompe con frecuencia antes de transferirse por completo, y como lo que confiere la masculinidad es el término de F, sólo una pequeña proporción de las células receptoras se convierten en células masculinas.

¿Cómo puede explicarse entonces la integración de F? Wollman y Jacob propusieron que algún tipo de recombinación entre F y el cromosoma de la célula F^+ generaría el cromosoma Hfr. Campbell contribuyó con una brillante aportación a esta idea. Propuso que si F, como el cromosoma, fuera circular, un hecho de recombinación entre los dos círculos produciría un

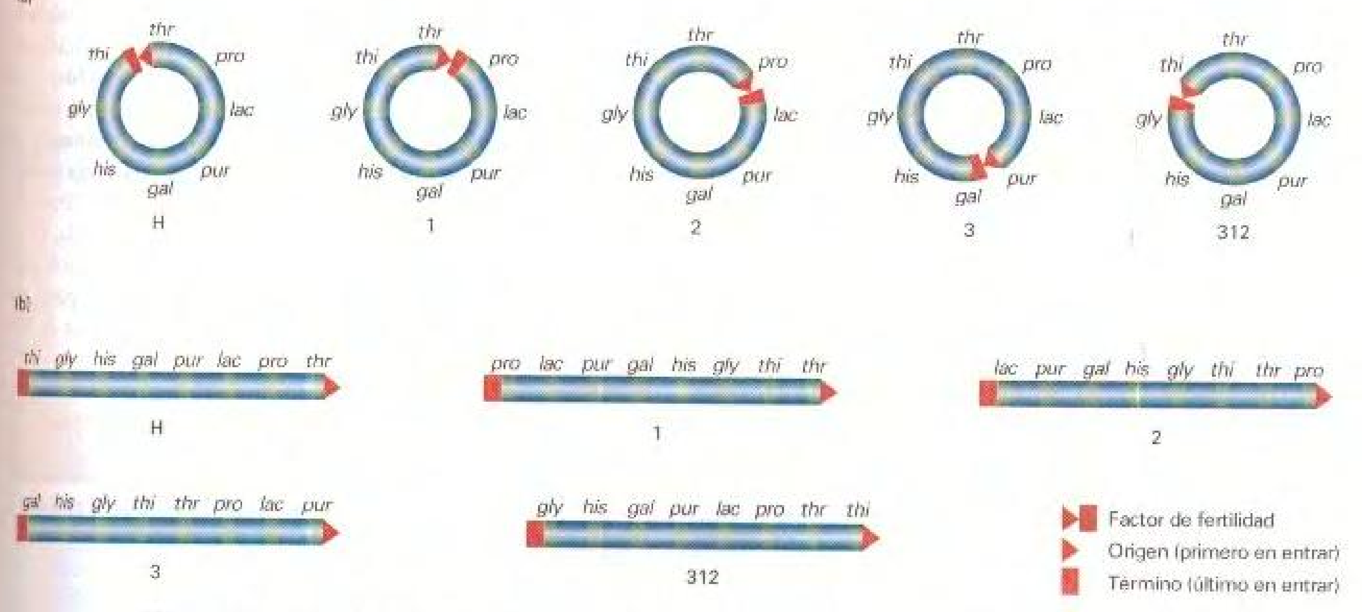


Figura 7-9. Circularidad del cromosoma de *E. coli*. (a) Mediante el uso de diferentes estirpes Hfr (H, 1, 2, 3, 312) que contienen el factor de fertilidad integrado en diferentes sitios del cromosoma y en distinta orientación, los experimentos de conjugación interrumpida indican que el cromosoma es circular. Se muestra el punto de movilización (origen) de cada estirpe. (b) Orden lineal de transferencia de marcadores de cada estirpe Hfr; las puntas de flecha indican el origen y la dirección de la transferencia.

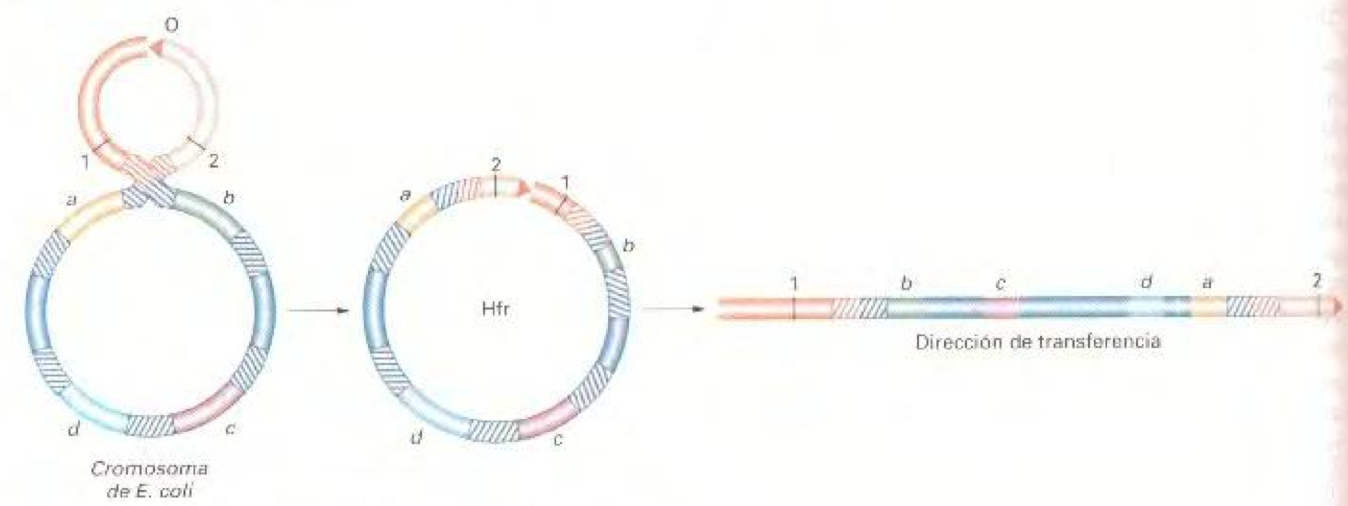


Figura 7-10. Integración del factor F en el cromosoma de *E. coli* mediante recombinación. Se muestran los marcadores hipotéticos de F 1 y 2 para indicar la dirección de la inserción. El origen (O) es el punto de movilización en el cual comienza la integración; la región de apareamiento es homóloga a una región del cromosoma de *E. coli*, *a-d* son los genes que representan el cromosoma de *E. coli*. Los genes sexuales de F son responsables del fenotipo F⁺. Las regiones de apareamiento (rayadas) son idénticas en el plásmido y el cromosoma, y derivan de unos elementos móviles denominados secuencias de inserción (véase Cap. 20). En este ejemplo, la célula Hfr generada por la inserción de F transferiría sus genes en el orden *a, d, c, b*. ¿Cuál sería el orden de transferencia si F se insertara en los demás sitios homólogos?

único círculo de mayor tamaño en el que F quedaría integrado (Fig. 7-10).

Suponga ahora que F está constituido por tres regiones diferentes, como se indica en la Figura 7-10. Si el cromosoma bacteriano tuviera varias regiones homólogas que pudieran emparejarse con la región de apareamiento de F, podrían generarse fácilmente distintos cromosomas Hfr por recombinación en esos sitios.

La circularidad del cromosoma y del factor F parecían inicialmente conceptos bastante inverosímiles, inferidos únicamente a partir de datos genéticos; la confirmación de su realidad física llegó sólo algunos años más tarde. El modelo de integración de recombinación directa también fue confirmado posteriormente.

El factor de fertilidad existe por tanto en dos estados: (1) en estado de plásmido, como elemento citoplásmico F libre que se transfiere con facilidad a las células receptoras F⁻, y (2) en estado integrado, como parte de un cromosoma circular que únicamente se transfiere en momentos tardíos de la conjugación. El término **episoma** (literalmente, «cuerpo adicional») fue acuñado para designar a una partícula genética que presenta esos dos estados característicos. Una célula portadora de F en estado libre se denomina F⁺, una célula con F en estado integrado se denomina Hfr, y una célula sin F se denomina F⁻. En la actualidad, el término **plásmido** se emplea para cualquier elemento circular en el citoplasma con capacidad de replicación autónoma, y el término «episoma» se usa en raras ocasiones.

Factores R

En los años 50 se descubrió en hospitales japoneses una prop dad espantosa de las bacterias patógenas. La disentería bacter na está causada por una bacteria del género *Shigella*. Inicialm te, se había comprobado que esta bacteria era sensible a u amplia gama de antibióticos, que fueron empleados para contr lar la enfermedad. Sin embargo, en los hospitales japoneses, l estirpes de *Shigella* aisladas de enfermos con disentería result ron ser resistentes simultáneamente a muchos de estos fármac incluyendo la penicilina, la tetraciclina, la sulfanilamida, la e treptomicina y el cloranfenicol. Este fenotipo de resistencia mú tiple se heredaba como un paquete genético único, y podía s transmitido de manera infecciosa, no sólo a otras estirpes de Sh

CUADRO 7-2. Determinantes genéticos transferidos por varios plásmidos

Característica	Ejemplos de plásmid
Fertilidad	F, R1, Col
Producción de bacteriocinas	Col E1
Resistencia a metales pesados	R6
Producción de enterotoxinas	Ent
Metabolismo del alcanfor	Cam
Generación de tumores en plantas	TI (en *Agrobacterium tu- mefaciens*)

gella sensibles, sino también a otras especies de bacterias relacionadas. Esta propiedad es extraordinariamente provechosa para la bacteria patógena, y sus consecuencias en la ciencia médica fueron terribles. En cambio, desde el punto de vista del genetista, esta situación es muy interesante. El vector que transportaba estas resistencias de una célula a otra resultó ser un elemento con capacidad de replicación autónoma, similar al factor F. Estos **factores R** (de «resistencia») se transfieren rápidamente por conjugación, tal como ocurre con la partícula F de *E. coli*.

De hecho, estos factores R fueron los primeros de muchos otros factores semejantes a F que se descubrieron más tarde. Se ha comprobado que estos elementos, que existen en el citoplasma en forma de plásmidos, llevan diferentes tipos de genes bacterianos. El Cuadro 7-2 muestra tan sólo algunas de las características que pueden ser transportadas por los plásmidos.

Mecanismos de transferencia

¿Muere una célula Hfr después de donar su cromosoma a una célula F^-? La respuesta es no (salvo que el cultivo se trate con estreptomicina). El cromosoma Hfr se replica mientras se transfiere una cadena sencilla a la célula F^-; esto garantiza que quede un cromosoma completo en la célula donante después de la conjugación. La cadena transferida se replica en la célula receptora, y los genes de la célula donante pueden incorporarse por recombinación al cromosoma de la célula receptora, generando una célula recombinante. Si esto no ocurre, los fragmentos de DNA transferidos se pierden en la célula receptora durante la división celular.

Suponemos que el cromosoma de la F^- es también circular, porque la célula receptora F^-, cuando recibe el factor F de una célula F^+, se convierte inmediatamente en una célula F^+, de la cual puede derivarse luego una célula Hfr.

Surge la imagen de un cromosoma circular desenrollando una copia de sí mismo, que es luego transferida de forma lineal a la célula F^-. ¿Cómo se consigue la transferencia? Los estudios de microscopia electrónica muestran que las células Hfr y F^+ poseen unas estructuras fibrosas, los **pili F**, que sobresalen de su pared celular, como muestra la Figura 7-4. Los pili F facilitan el contacto entre las células, durante el que ocurre la transferencia del DNA a través de poros de la célula F^-.

El proceso de conjugación de *E. coli*

Revisemos ahora los distintos aspectos del proceso de conjugación de *E. coli* (Fig. 7-11) en cuanto a las diferencias entre las células F^-, F^+ y Hfr, ya que estas diferencias representan un resumen del ciclo.

Las estirpes F^- carecen del factor F y no pueden transferir DNA por conjugación. Sin embargo, actúan como receptoras del DNA transferido por las células F^+ o Hfr durante la conjugación.

Las células F^+ contienen el factor F en su citoplasma y, por tanto, pueden transferirlo de modo eficaz a las células F^- durante la conjugación.

Las células Hfr contienen el factor F integrado en el cromosoma bacteriano y no en el citoplasma.

Una estirpe F^+ transfiere marcadores cromosómicos porque, en cualquier población de células F^+, una pequeña proporción de células (aproximadamente 1 de cada 1000) se ha convertido en Hfr por integración de F en el cromosoma bacteriano. Como los

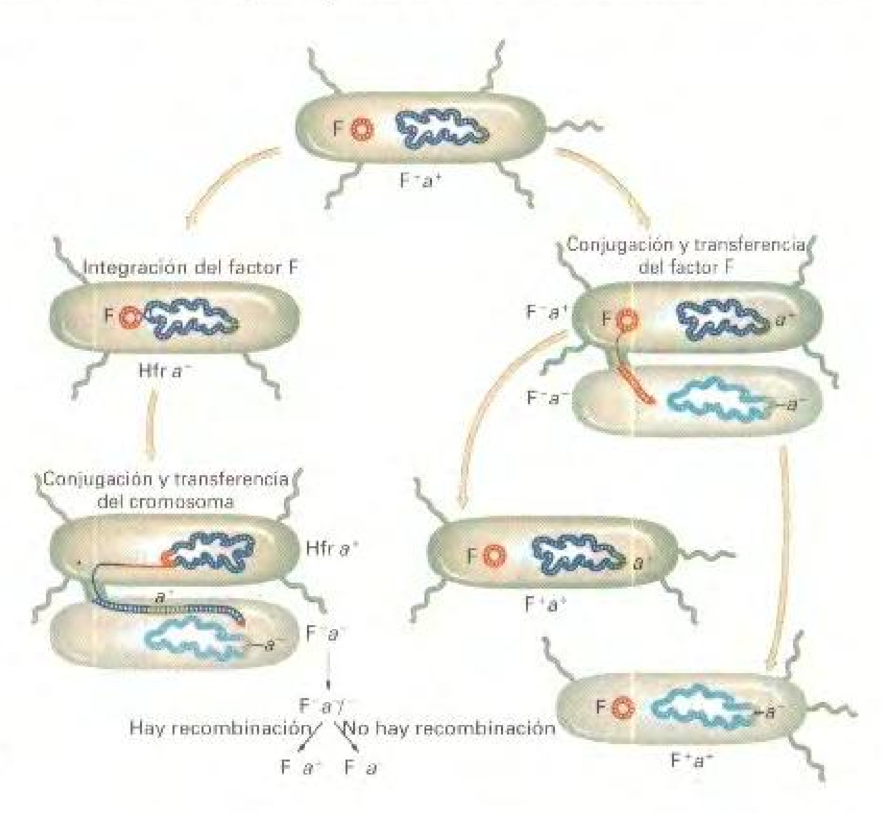


Figura 7-11. Resumen de los distintos acontecimientos que tienen lugar en el ciclo de conjugación de *E. coli*.

experimentos de conjugación suelen realizarse mezclando 10^7-10^8 células del donante y del receptor, la población contendrá varias células Hfr diferentes, derivadas de integraciones independientes de F en varios sitios distintos del cromosoma. Por tanto, cuando distintas células de la población transfieren marcadores cromosómicos, la transferencia comienza en distintos puntos del cromosoma. El resultado es la transferencia casi por igual de cualquier marcador cromosómico, aunque con baja frecuencia. Este tipo de transferencia mediada por células F^+ es la que Lederberg y Tatum observaron cuando descubrieron la transferencia génica en bacterias.

En una población F^+, cada una de las células Hfr con un factor F integrado puede dar origen a una nueva estirpe Hfr si se aísla y se utiliza para iniciar un clon.

Las **estirpes Hfr** se originan a partir de un clon de células Hfr en las cuales ha tenido lugar una integración específica del factor F en el cromosoma bacteriano. Por tanto, todas las células de una estirpe Hfr determinada contienen una copia de F integrada exactamente en la misma posición del cromosoma.

En comparación con las células F^+, en las que sólo una pequeña fracción de las células tiene F integrado en el cromosoma, las poblaciones Hfr transfieren marcadores cromosómicos a las células F^- con una frecuencia elevada. Además, en cualquier estirpe Hfr, los marcadores se transfieren desde un punto fijo y en un orden determinado. Esto también contrasta con lo que ocurre en las poblaciones de células F^+, donde las células Hfr transfieren marcadores cromosómicos sin ningún orden particular, debido a que el factor F se integra en distintos puntos del cromosoma en diferentes células F^+.

En un cruzamiento Hfr × F^-, las células F^- no se convierten en Hfr o en F^+, excepto en raras ocasiones, porque el cromosoma Hfr casi siempre se rompe antes de que el término de F se transfiera a la célula F^-.

Recombinación entre genes marcadores después de la transferencia

Hasta ahora, sólo hemos estudiado el proceso de transferencia de información genética entre los individuos que participan en el cruzamiento. La existencia de esta transferencia se infiere a partir de la aparición de recombinantes entre los descendientes del cruzamiento. Sin embargo, antes de que se produzca un recombinante estable, los genes transferidos deben integrarse o incorporarse en el genoma del receptor mediante un mecanismo de intercambio. Consideraremos ahora algunas de las propiedades características de este intercambio.

El intercambio genético en procariotas no se produce entre los dos genomas completos (como ocurre en eucariotas); más bien tiene lugar entre un genoma *completo*, el de la célula F^-, denominado **endogenote**, y otro *incompleto*, del donante, denominado **exogenote**. De hecho, lo que obtenemos es un diploide parcial o **merocigoto**. La genética bacteriana es la genética de la merocigosis. La Figura 7-12*a* presenta el esquema de un merocigoto.

Un solo hecho de recombinación no sería muy útil para generar recombinantes viables, porque el círculo se rompería y se formaría un cromosoma lineal extraño, parcialmente diploide (Fig. 7-12*b*). Para mantener intacto el círculo, debe producirse un número par de entrecruzamientos (Fig. 7-12*c*). El fragmento producido como resultado de este tipo de recombinación es sólo un genoma parcial, que generalmente se pierde durante el crecimiento celular posterior. Por tanto, no sobreviven los dos productos recíprocos de la recombinación (sólo lo hace uno de ellos). Un aspecto único del intercambio genético en bacterias es que en la mayoría de los casos podemos olvidarnos de los productos recíprocos de la recombinación.

COROLARIO

En la genética bacteriana se estudian los dobles entrecruzamientos y no se espera que aparezcan recombinantes recíprocos.

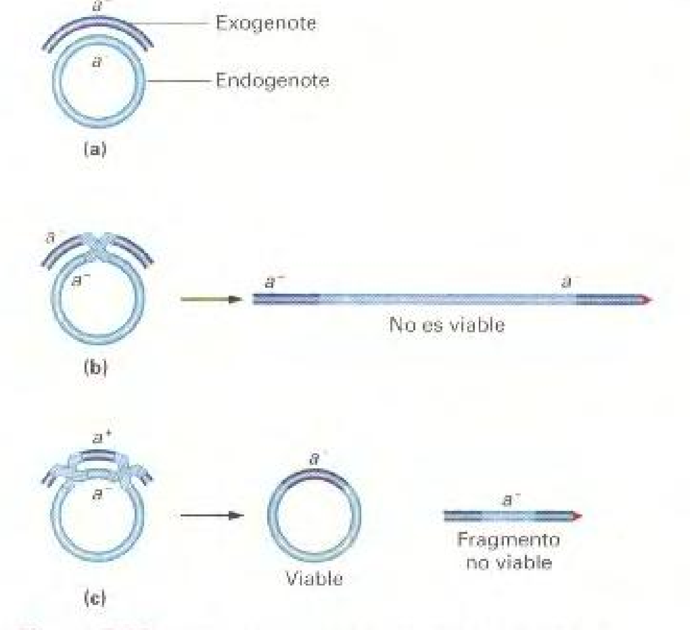


Figura 7-12. Recombinación entre exogenote y endogenote en un merocigoto. (a) El merocigoto. (b) Un único entrecruzamiento genera un cromosoma lineal parcialmente diploide. (c) Un número par de entrecruzamientos conduce a la formación de un círculo más un fragmento lineal.

El gradiente de transferencia

El merocigoto es un diploide parcial y algunos genes no llegan ni siquiera a participar en el proceso. Para apreciarlo mejor, volvamos a fijarnos en las consecuencias de la transferencia génica. En la célula receptora, normalmente, sólo aparece un fragmento del cromosoma donante, debido a que el proceso de conjugación se interrumpe espontáneamente, de manera que rara vez se transfiere el cromosoma completo. Una vez que la transferencia ha comenzado, la rotura espontánea puede ocurrir en cualquier momento. Esta situación genera un **gradiente de transferencia** natural y hace cada vez menos probable que la célula receptora reciba los marcadores genéticos más tardíos («tardíos» se refiere, en este caso, a los marcadores que están cada vez más alejados del origen y se transfieren, por tanto, más tarde). Por ejemplo, en un cruzamiento en el que la estirpe Hfr donante transfiere

los marcadores en el orden *met, arg, leu*, se espera una distribución de fragmentos como la que se representa a continuación:

leu^+ — arg^+ — met^+ →

arg^+ — met^+ →

arg^+ — met^+ →

met^+ →

met^+ →

met^+ →

Observe que hay muchos más fragmentos que contienen el locus *met* que el locus *arg*, y que el locus *leu* sólo está presente en un fragmento. Es sencillo ver que cuanto más cerca está un marcador del origen, más probable será que se transfiera durante la conjugación.

El concepto de gradiente de transferencia es idéntico al descrito anteriormente para los experimentos de conjugación interrumpida, exceptuando que en este caso estamos permitiendo la interrupción natural del proceso en vez de interrumpirlo mecánicamente.

Determinación del orden de los genes por gradiente de transferencia

Podemos servirnos del gradiente natural de transferencia para ordenar los marcadores genéticos, siempre que seleccionemos un marcador temprano que entre antes que los marcadores que deseamos ordenar. Veamos cómo se lleva a cabo. Supongamos que empleamos una estirpe Hfr que transfiere los siguientes marcadores en el orden *met, arg, aro, his*. En un cruzamiento entre una estirpe Hfr que es met^+ arg^- aro^+ his^+ str^r y una F^- que sea met^- arg^- aro^- his^- str^r, se seleccionan recombinantes que crezcan en medio mínimo sin metionina, pero con arginina, aminoácidos aromáticos e histidina, en presencia de estreptomicina. En este caso estamos seleccionando recombinantes en las estirpes F^- que sean met^+ en un cruzamiento en el cual el locus *met* es el primer marcador que se transfiere. A continuación, podríamos estudiar la herencia de los otros marcadores presentes en la estirpe Hfr, comprobando su crecimiento en medio mínimo con suplementos y en ausencia de cada uno de los nutrientes requeridos. Un resultado típico sería:

$$met^+ = 100\,\%$$
$$arg^+ = 60\,\%$$
$$aro^+ = 20\,\%$$
$$his^+ = 4\,\%$$

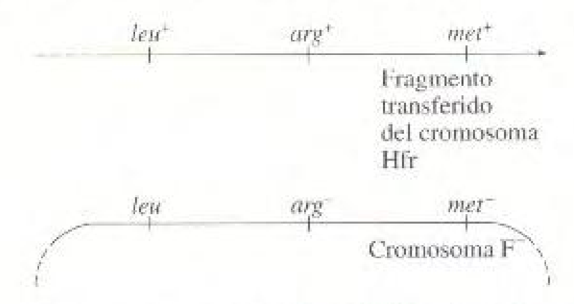
Observe que la frecuencia con la que se heredan los marcadores se corresponde con el orden de transferencia. Para que este método funcione, es crucial que se aplique a marcadores genéticos que entren después del marcador seleccionado, en este caso, después de *met*.

Cartografía de mayor resolución mediante frecuencias de recombinación en cruzamientos bacterianos

Los experimentos de conjugación interrumpida y el gradiente natural de transferencia ofrecen un basto conjunto de datos de posiciones de los genes a lo largo de todo el mapa, pero se requieren otros métodos para obtener una mayor resolución en la cartografía de marcadores cercanos. En este apartado consideraremos una forma de abordar el problema, empleando las frecuencias de recombinación para medir el ligamiento.

Los primeros intentos de elaborar mapas genéticos a partir de experimentos de conjugación se vieron dificultados por el desconocimiento de que sólo se transfieren fragmentos del cromosoma y de que el gradiente de transferencia produce una tendencia hacia la incorporación de los marcadores más cercanos al origen. Para medir el ligamiento y dar algún significado a los cálculos de las distancias de mapa, es necesario establecer una situación en la que cada marcador tenga la misma oportunidad de ser transferido, de manera que las frecuencias de recombinación dependan sólo de la distancia entre los genes de interés.

Supongamos que tenemos que cartografiar tres marcadores: *met, arg* y *leu*. Si el orden es *met, arg* y *leu*, y *met* es el primero que se transfiere y *leu* el último, entonces desearíamos obtener una situación como la representada en el diagrama inferior para calcular las distancias de mapa entre estos marcadores:



Simplemente tenemos que seleccionar el *último* marcador que entra, que en este caso es *leu* ¿Por qué? Porque si seleccionamos el último marcador tendremos la seguridad de que todas las células que recibieron fragmentos con el último marcador también recibieron los marcadores anteriores, es decir, *arg* y *met*, en los mismos fragmentos. Podemos calcular la distancia de mapa del modo clásico, donde la unidad de mapa (u.m.) es equivalente al porcentaje de entrecruzamientos en el intervalo correspondiente del mapa. En la práctica, esto se hace calculando el porcentaje de los recombinantes producidos por recombinación entre dos marcadores, entre el total de recombinantes producidos. Veamos un ejemplo.

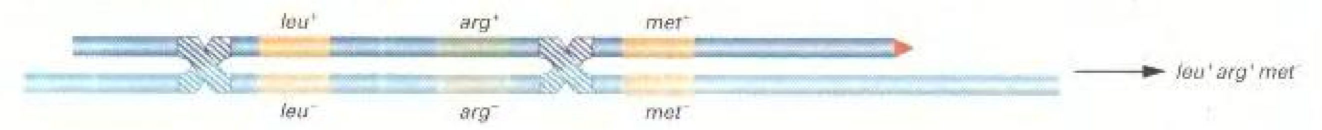
Cruzamiento modelo

En el cruzamiento de la estirpe Hfr que acabamos de describir (met^+, arg^+, leu^+, str^s) con una estirpe F^- de genotipo met^-, arg^-, leu^-, str^r, seleccionaríamos los recombinantes leu^+ y luego buscaríamos los marcadores *arg* y *met*. En este caso, los marcadores *arg* y *met* se denominan **marcadores no seleccionados**. La Figura 7-13 ilustra los tipos de entrecruzamientos esperados. Observe que se necesitan dos hechos de recombinación para in-

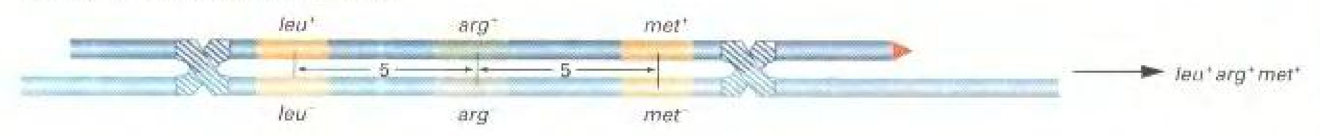
(a) Integración sólo del marcador tardío



(b) Integración del marcador tardío y uno de los tempranos



(c) Integración de todos los marcadores



(d) Integración de los dos marcadores extremos, pero no del central



Figura 7-13. Incorporación de un marcador tardío en un cromosoma F^- de *E. coli*. Después del cruzamiento con una cepa Hfr, se selecciona el marcador leu^+, que se transfiere tardíamente. Los marcadores tempranos (arg^+ y met^+) pueden ser o no incorporados, dependiendo del sitio donde ocurre la recombinación entre el fragmento Hfr y el cromosoma F^-. Como se indica en (c), se producirán entrecruzamientos en alguno de estos intervalos el 5 % de las veces, que generarán recombinantes leu^+ arg^- met^- (a) y leu^+ arg^+ met^- (b). Los entrecruzamientos que ocurren fuera de estos intervalos pueden generar el recombinante leu^+ arg^+ met^+ (c). El recombinante leu^+ arg^- met^+ requiere dos entrecruzamientos adicionales (d).

corporar parte del fragmento entrante en el cromosoma F^-. Debe producirse un hecho de recombinación a cada lado del marcador seleccionado (*leu*). Así, en la Figura 7-13, un entrecruzamiento debe producirse a la izquierda del marcador *leu* y el otro a la derecha. Supongamos que la distancia en el mapa entre cada marcador es 5 u.m. (un 5 % de recombinación). En un 5 % del total de recombinantes leu^+, el segundo entrecruzamiento ocurrirá entre *arg* y *arg* (Fig. 7-13*a*); en otro 5 % de los casos, el segundo entrecruzamiento ocurrirá entre *arg* y *met* (Fig. 7-13*b*). Esperaríamos entonces que el 90 % de los recombinantes leu^+ seleccionados fueran arg^+ met^+, ya que el segundo entrecruzamiento ocurre fuera del intervalo *leu-arg-met* (Fig. 7-13*c*) en un 90 % de los casos. También esperaríamos que un 5 % de los recombinantes leu^+ fueran arg^- met^-, como resultado de un entrecruzamiento entre *leu* y *arg*, y que otro 5 % de los recombinantes leu^+ fueran arg^+ met^-, producidos por recombinación entre *arg* y *met*. En realidad, simplemente estamos determinando el porcentaje de veces que el segundo entrecruzamiento ocurre en cada uno de los tres intervalos posibles.

En un cruzamiento como el descrito, hay una clase de recombinantes que requiere dos hechos de recombinación adicionales (Fig. 7-13*d*). En este caso, los recombinantes leu^+ arg^- met^+ necesitarían cuatro entrecruzamientos en lugar de dos. Estos recombinantes raramente se observan, debido a que su frecuencia se ve muy reducida en comparación con las otras dos clases.

Transferencia infecciosa de genes marcadores por episomas

El trabajo de Edward Adelberg llevó al descubrimiento de la transferencia de genes con alta frecuencia mediada por episomas. Cuando en 1959 inició sus estudios sobre recombinación, la estirpe Hfr concreta con la que trabajó producía células F^+, por lo que las frecuencias de recombinación no eran muy altas. Adelberg denominó F′ a este factor de fertilidad concreto para distinguirlo del factor **F** normal, por las siguientes razones:

1. La estirpe F^+ portadora del factor F′ volvía a convertirse en estirpe Hfr mucho más frecuentemente que las estirpes típicas F^+.

2. F′ siempre se integraba en la *misma posición*, dando lugar al cromosoma Hfr original. (Recuerde que las estirpes Hfr derivadas al azar de machos F^+ tienen los orígenes de transferencia en posiciones distintas).

¿Cómo podrían explicarse estas propiedades características de F′? La respuesta llegó cuando se obtuvo otro factor F′ a partir de una estirpe Hfr en la que el locus lac^+ se encontraba cerca del extremo terminal del cromosoma Hfr (se transfería muy tarde

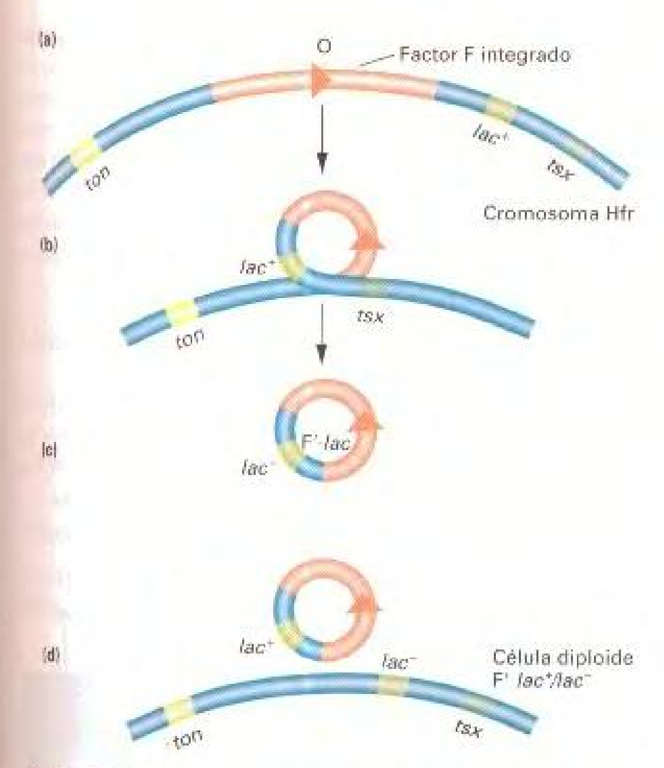


Figura 7-14. Formación y reintegración de un factor F', en este caso F'lac. (a) F aparece integrado entre los alelos *ton* y *lac*$^+$ de una estirpe Hfr. (b y c) La escisión y separación errónea incluye al locus *lac*, produciendo una partícula F' *lac*$^+$. (d) La transferencia de la partícula F' *lac* a una estirpe receptora F$^-$ *lac*$^-$ genera un diploide parcial F *lac*$^+$/*lac*$^-$. (De G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.ª ed. Copyright © 1978 por W. H. Freeman and Company, Nueva York.)

Utilizando esta estirpe Hfr *lac*$^-$, François Jacob y Adelberg encontraron un derivado F$^+$ que transfería *lac*$^+$ a estirpes receptoras F$^-$ *lac*$^-$ con una frecuencia muy elevada. Además, las células receptoras que se comportaban como F$^+$ *lac*$^+$ producían en ocasiones células hijas F$^-$ *lac*$^-$ con una frecuencia de 1×10^{-3}. Por tanto, el genotipo de los receptores parecía ser F *lac*$^+$/*lac*$^-$.

Ahora ya tenemos la pista: F' es un elemento citoplásmico que lleva parte del cromosoma bacteriano. De hecho, no es más que un factor F que ha integrado un fragmento del cromosoma de la célula hospedadora. En la Figura 7-14 se ilustra el proceso por el que se origina y se reintegra. Este factor F' concreto se conoce como F'-*lac*, porque el fragmento cromosómico incorporado contiene el gen *lac*. Se han aislado factores F' con muchos genes cromosómicos diferentes y se han denominado de una forma acorde. Por ejemplo, los factores F' portadores de *gal* o *trp* se conocen como F'-*gal* o F'-*trp*, respectivamente. Puesto que las células F *lac*$^+$/*lac*$^-$ presentan fenotipo Lac$^+$, podemos deducir que *lac*$^+$ es dominante sobre *lac*$^-$. Como veremos más adelante, en el Capítulo 11, las relaciones de dominancia-recesividad entre alelos aportan una información muy útil a la hora de interpretar la función de un gen.

La diploidía parcial de segmentos específicos del genoma puede generarse utilizando un conjunto de F' originados a partir de estirpes Hfr. Las células F' se seleccionan determinando si hay transferencia infecciosa de genes normalmente tardíos de una estirpe Hfr específica. Algunas estirpes F' llevan fragmentos muy grandes (hasta una cuarta parte) del cromosoma bacteriano; si se utilizan marcadores adecuados, los merocigotos generados pueden ser utilizados en estudios de recombinación.

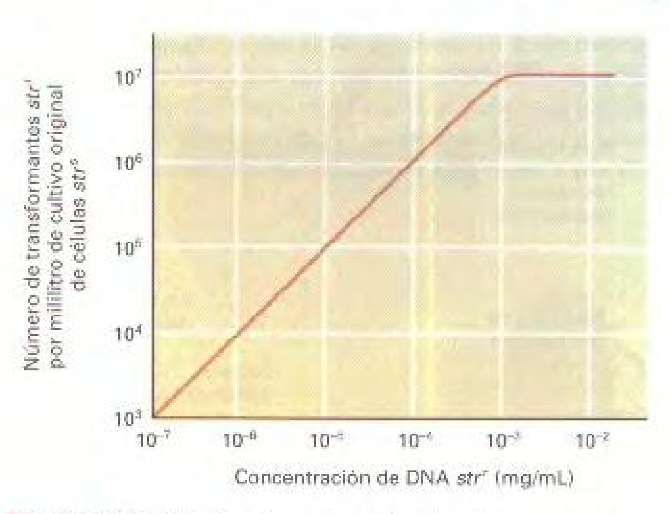


Figura 7-15. Transferencia genética de la resistencia a estreptomicina (str^r) a células de *E. coli* sensibles a estreptomicina (str^s). La obtención de transformantes str^r entre las células str^s depende de la concentración de DNA str^r utilizada. (De G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.ª ed. Copyright © 1978 por W. H. Freeman and Company, Nueva York.)

COROLARIO

Durante la conjugación entre un donante Hfr y un receptor F$^-$, los genes del donante se transfieren *linealmente* a la célula F$^-$ a través del cromosoma bacteriano, siendo el factor de fertilidad el último que se transfiere.

Durante la conjugación entre un donante F' portador de un plásmido F' y un receptor F$^-$, puede producirse la transferencia *infecciosa* de una parte concreta del genoma donante a la célula F$^-$, por medio del plásmido. La parte que se transmite se encontraba originalmente al lado del locus F en la estirpe Hfr a partir de la que se originó la estirpe F'.

Transformación bacteriana

Algunas bacterias cuentan con otro método de transferencia de DNA y producción de recombinantes que no requiere conjugación. La conversión de un genotipo en otro por la introducción de DNA exógeno (es decir, fragmentos de DNA de una fuente externa) recibe la denominación de **transformación**. Este proceso fue descubierto en *Streptococcus pneumoniae*, en 1928, por Frederick Griffith. En 1944, Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod y Maclyn McCarty demostraron que el «principio transformante» era el DNA. Ambos resultados constituyen hitos históricos en la elucidación de la naturaleza molecular de los genes. Trataremos este trabajo con más detalle en el Capítulo 8.

Tras la demostración de que el DNA era el agente que determinaba el componente polisacarídico de *S. pneumoniae*, se demostró la existencia de transformación para otros genes, tales como los que confieren resistencia a antibióticos (Fig. 7-15). El principio transformante, DNA exógeno, se incorpora al cromoso-

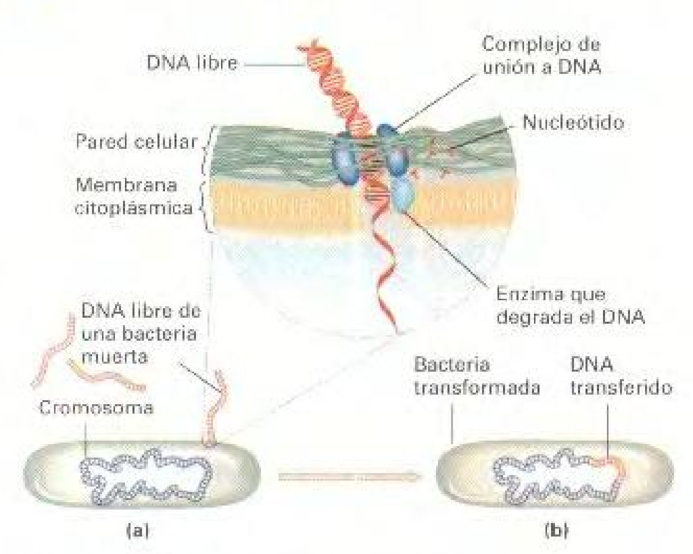


Figura 7-16. Una bacteria en el proceso de transformación (a) recoge DNA libre procedente de una célula bacteriana muerta. Complejos de unión a DNA localizados en la superficie de la bacteria incorporan el DNA (círculo ampliado) y las enzimas degradan una cadena de DNA hasta nucleótidos, mientras que la otra cadena se integra en el cromosoma de la bacteria (b). (Modificado de R. V. Miller, «Bacterial Gene Swapping in Nature.» Copyright © 1998, por Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.)

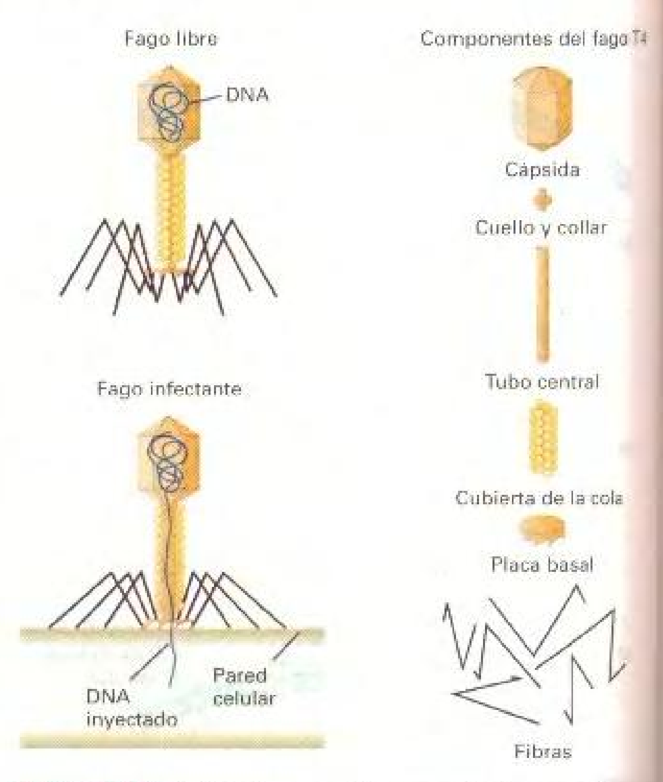


Figura 7-17. El fago T4, representado en su estado libre y en el momento de infectar a una célula de *E. coli*. Durante el proceso de infección, el fago inyecta su DNA dentro de la célula a través del hueco de la cola. En la parte derecha, el fago se ha desensamblado en sus diferentes componentes para mostrar su estructura tridimensional extraordinariamente organizada. (Modificado de R. S. Edgar y R. H. Epstein, «The Genetics of a Bacterial Virus». Copyright © 1965 por Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.)

ma bacteriano mediante un proceso de rotura e inserción análogo al descrito para los cruzamientos Hfr × F^- de la Figura 7-12. Sin embargo, observe que durante la *conjugación*, el DNA se transfiere desde una célula viva a otra mediante un contacto íntimo, mientras que en la *transformación*, la célula adquiere fragmentos aislados de DNA externo. La Figura 7-16 describe este proceso.

Análisis del ligamiento por transformación

La transformación ha sido un instrumento muy útil en varias áreas de la investigación con bacterias. Más adelante trataremos su aplicación en algunas de las técnicas de Ingeniería genética. En este apartado, examinaremos su utilidad en relación con la obtención de información de las relaciones de ligamiento.

Cuando se extrae DNA (el cromosoma bacteriano) para realizar experimentos de transformación, es inevitable que se produzca la ruptura parcial del DNA en fragmentos más pequeños. Si dos genes donantes están situados muy próximos en el cromosoma, existe una alta probabilidad de que ambos se transfieran en el mismo fragmento de DNA transformante y se produzca, por tanto, una **transformación doble**. Por el contrario, si los genes están muy separados en el cromosoma, lo más probable es que estén contenidos en segmentos transformantes diferentes y la frecuencia de transformantes dobles será igual al producto de las frecuencias de transformación de cada gen por separado. Por tanto, debe ser posible comprobar un estrecho ligamiento entre dos genes mediante el análisis de la desviación de la regla del producto.

Desgraciadamente, hay varios factores que complican la situación, de los cuales el más importante es que no todas las células de una población bacteriana se encuentran en estado de **competencia** para ser transformadas. Debido a que las transformaciones

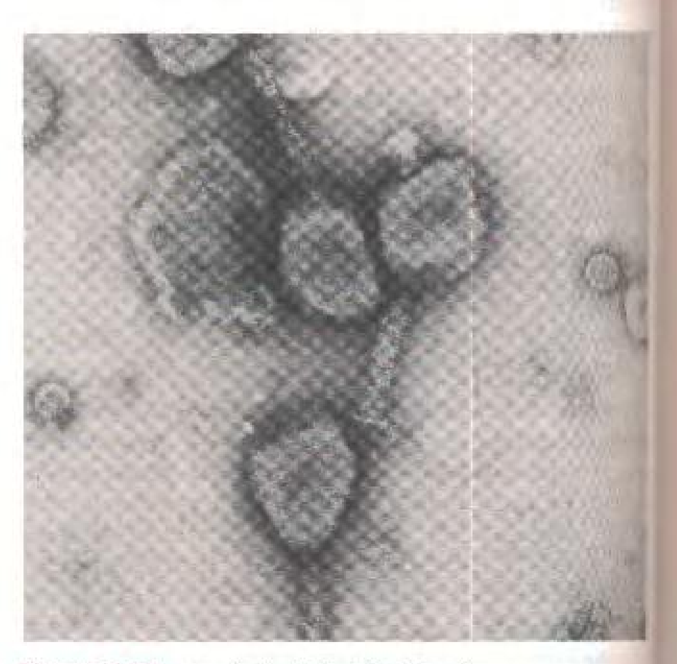


Figura 7-18. Ampliación del fago T4 de *E. coli* que muestra su estructura en detalle: obsérvese la cápsida, la cola y las fibras de la cola. El fago T4 fue empleado por Benzer en sus experimentos sobre la naturaleza del gen *rII* (de lisis rápida). (Fotografía de Jack D. Griffith.)

individuales se expresan como proporciones, el éxito de la regla del producto obviamente depende del tamaño absoluto de estas proporciones. Hay modos de calcular la proporción de células competentes, pero en este momento no es necesario que desviemos nuestra atención a este tema. Puede ampliar sus conocimientos sobre el análisis de ligamiento por transformación, resolviendo uno de los problemas que aparecen al final del capítulo, en el que se supone un 100 % de competencia en las células receptoras.

Genética de bacteriófagos

En este apartado, describiremos cómo se realizan los cruzamientos con virus que infectan bacterias (fagos) y los experimentos que analizan minuciosamente la estructura fina del gen.

Infección de bacterias por fagos

La mayoría de las bacterias son susceptibles al ataque por bacteriófagos, que literalmente significa «comedores de bacterias». Un fago está constituido por un «cromosoma» de ácido nucleico (DNA o RNA) rodeado por una cubierta de moléculas de proteína. Una serie de fagos bien estudiados son los que se conocen como T1, T2, etc. Las Figuras 7-17 y 7-18 muestran la estructura de un fago perteneciente a la serie denominada **fagos T-par** (T2, T4, etc.)

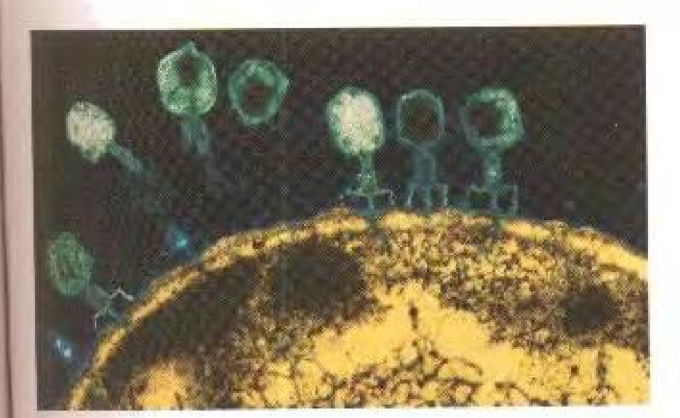


Figura 7-19. Micrografía de un bacteriófago adsorbiéndose a una bacteria inyectando su DNA. (Dr. L. Caro/Science Photo Library, Photo Researches.)



Figura 7-20. Partículas descendientes del fago λ madurando dentro de una célula de *E. coli*. (Jack D. Griffith.)

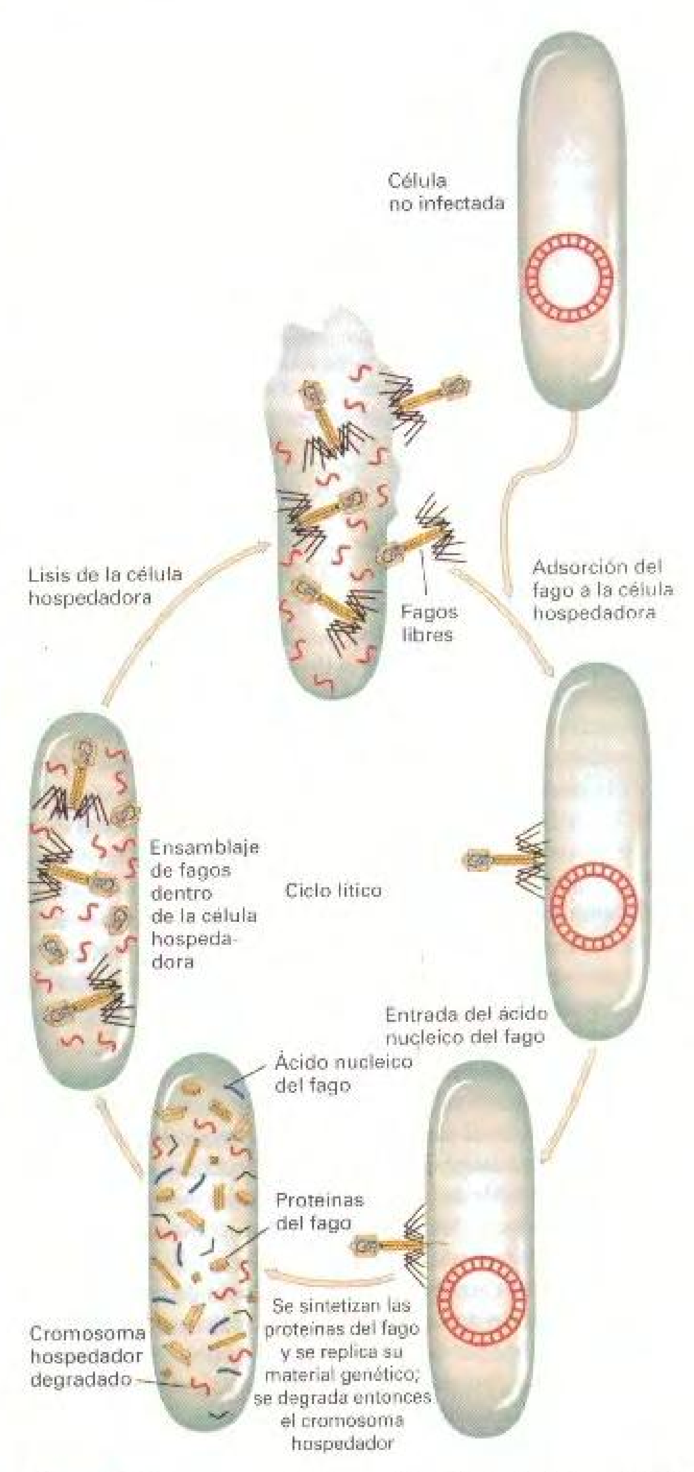


Figura 7-21. Ciclo lítico de un bacteriófago de transducción generalizada. (Modificado de J. Darnell, H. Lodish, y D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*. Copyright © 1986 por W. H. Freeman and Company.)

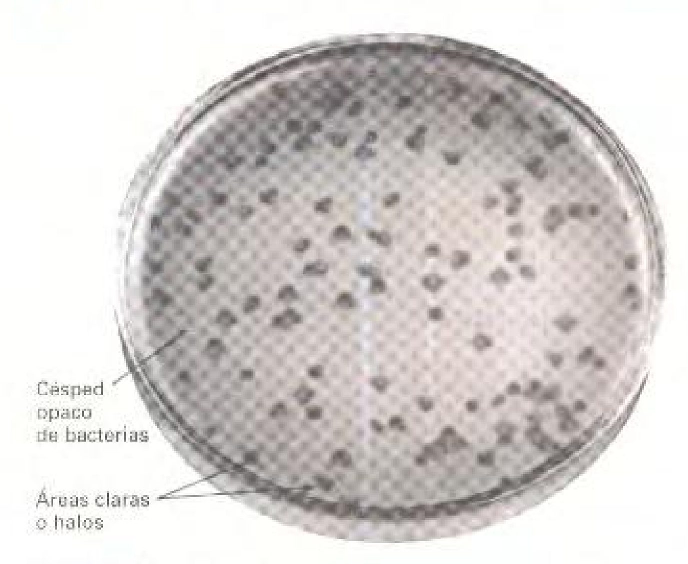


Figura 7-22. Aspecto de los halos producidos por un fago. Se extienden unos pocos fagos sobre una placa de medio sólido que contiene un césped de *E. coli* bien crecido. Cada fago infecta una célula bacteriana, dando lugar a 100 o más fagos descendientes que son liberados por lisis de la célula de *E. coli* y que a su salida infectan a células vecinas. Éstas, a su vez, sufren el mismo proceso, que continúa hasta que aparece una zona clara o halo, sobre el césped de bacterias. (De G. S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Copyright © 1963 por W. H. Freeman and Company.)

Durante la infección, el fago se adsorbe a una bacteria e inyecta su material genético dentro del citoplasma (Fig. 7-19). La información genética del fago pasa entonces a controlar la maquinaria de la célula bacteriana, desconectando la síntesis de componentes bacterianos y redirigiendo los materiales de síntesis de la bacteria hacia la fabricación de componentes del fago (Fig. 7-20). (La utilización de la palabra *información* tiene interés en este contexto, ya que significa literalmente «dar forma». Y ése es precisamente el papel del material genético del virus: suministrar órdenes para crear formas. En este caso, la forma es la estructura elegantemente simétrica de los nuevos fagos). Finalmente, se libera un elevado número de fagos descendientes cuando se rompe la pared de la célula bacteriana. Este proceso de rotura se denomina **lisis**.

Pero ¿cómo podemos estudiar el fenómeno de la herencia en fagos, si éstos son tan pequeños que sólo son visibles al microscopio electrónico? En el caso de los fagos, no se producen colonias visibles mediante siembra en placa, pero podemos producir una manifestación visible de las bacterias infectadas aprovechando algunas propiedades de los fagos. Veamos las consecuencias de la infección de una bacteria por un fago. La Figura 7-21 nos muestra la secuencia de acontecimientos en el ciclo de infección que lleva a la liberación de los fagos descendientes fuera de la célula lisada. Tras la lisis, los fagos descendientes infectan a las bacterias vecinas. Este fenómeno produce un incremento exponencial del número de células lisadas. Quince horas después del comienzo de un experimento de este tipo, los efectos son detectables a simple vista, observándose un área clara, **calva** o **halo de lisis**, en el césped opaco de bacterias que crecen sobre la superficie de una placa con medio sólido (Fig. 7-22). Dependiendo del genotipo del fago, estos halos pueden ser grandes o pequeños, claros o turbios, etc. Por tanto, la **morfología del halo** es un carácter del fago que puede ser objeto de análisis. Otro carácter fenotípico de los fagos que puede ser analizado genéticamente es el **espectro de hospedadores**, ya que los fagos pueden diferir en las estirpes bacterianas que infectan y lisan. Por ejemplo, algunas estirpes bacterianas son inmunes a la adsorción o a la inyección del material genético de ciertos fagos específicos.

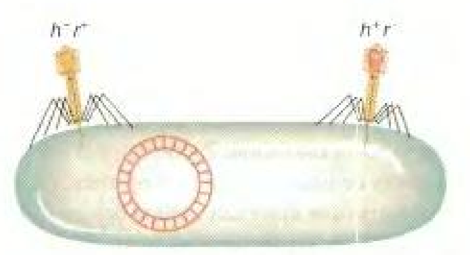


Figura 7-23. Infección mixta de *E. coli* por dos fagos.

Cruzamientos con fagos

¿Podemos cruzar dos fagos de la misma manera en que cruzamos dos estirpes bacterianas? Podemos ilustrar el proceso utilizando un cruzamiento entre fagos T2, estudiados originalmente por Alfred Hershey. Los genotipos de dos estirpes parentales son $h^- r^+$ y $h^+ r^-$. Los alelos corresponden a los siguientes fenotipos: h^- infecta a dos estirpes diferentes de *E. coli* (que podemos llamar estirpes 1 y 2); h^+ infecta exclusivamente a la estirpe 1; r^+ lisa las células con rapidez, produciendo así halos grandes; y r^- lisa las células lentamente, produciendo halos pequeños.

En el cruzamiento, se infecta la estirpe 1 de *E. coli* con los dos fagos parentales T2, en una relación de fagos:bacterias (denominada **multiplicidad de infección**) suficientemente alta para asegurar que una gran proporción de células sean infectadas simultáneamente por ambos tipos de fagos. Este tipo de infección (Fig. 7-23) se denomina **infección mixta** o **infección doble**. El lisado de fagos (la descendencia) se analiza mediante su extensión sobre un césped de bacterias compuesto por una mezcla de las estirpes 1 y 2 de *E. coli*. Pueden distinguirse cuatro tipos de halos (Fig. 7-24 y Cuadro 7-3). Estos cuatro genotipos pueden clasificarse fácilmente como parentales ($h^- r^+$ y $h^+ r^-$) y recom-

CUADRO 7-3. Tipos de halos producidos por los fagos descendientes del cruzamiento $h^- r^+ \times h^+ r^-$

Fenotipo	Genotipo inferido
Claro y pequeño	$h^- r^+$
Turbio y grande	$h^- r^-$
Turbio y pequeño	$h^+ r^+$
Claro y grande	$h^- r^-$

Nota: la claridad se debe al alelo h^-, que permite la infección de las dos estirpes bacterianas que constituyen el césped; la turbidez se debe al alelo h^+, que limita la infección a las células de la estirpe 1.

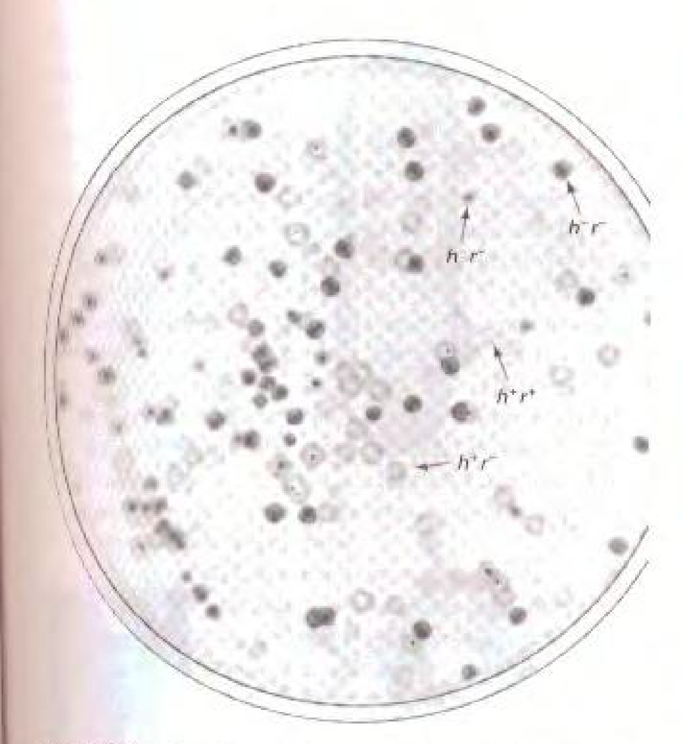


Figura 7-24. Fenotipos de los halos producidos por los descendientes del cruzamiento $h^- r^+ \times h^+ r^-$. Se añaden suficientes fagos de cada genotipo para asegurar que la mayoría de las bacterias será infectada al menos por un fago de cada tipo. Tras la lisis celular, se recogen los fagos descendientes y se añaden a un césped apropiado de *E. coli*. Pueden distinguirse cuatro fenotipos entre los halos, dos que corresponden a los dos tipos parentales y otros dos a los recombinantes. (De G. S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Copyright © 1963 por W. H. Freeman and Company.)

binantes ($h^+ r^+$ y $h^- r^-$), pudiendo calcularse la frecuencia de recombinación del modo siguiente:

$$\text{RF} = \frac{(h^+ r^+) + (h^- r^-)}{\text{n.° de halos totales}}$$

Si suponemos que recombinan los genomas completos de los fagos, pueden ocurrir entrecruzamientos sencillos que dan lugar a productos recíprocos viables, al contrario que en los cruzamientos bacterianos donde se requieren dos hechos de recombinación. Sin embargo, el análisis de los cruzamientos de fagos está sujeto a ciertas complicaciones. En primer lugar, pueden ocurrir varios ciclos de intercambio en el interior del hospedador: un recombinante producido inmediatamente después de la infección puede sufrir otros intercambios posteriormente. En segundo lugar, puede producirse la infección doble tanto de fagos genéticamente similares como de fagos diferentes. Por tanto, suponiendo el caso de dos fagos parentales P_1 y P_2, además del cruzamiento de interés $P_1 \times P_2$, ocurren al mismo tiempo cruzamientos $P_1 \times P_1$ y $P_2 \times P_2$. Por estos dos motivos, los recombinantes obtenidos en los cruzamientos entre fagos son el resultado de un *conjunto* de hechos, más que de hechos de intercambio individuales bien definidos. No obstante, *siempre que el resto de condiciones sean iguales*, el cálculo de la RF es un índice válido de las distancias de mapa en fagos.

CUADRO 7-4. Fenotipos de halos producidos mediante diferentes combinaciones de estirpes de *E. coli* y de fagos

	Estirpe de *E. coli*	
Estirpe del fago T4	B	K
rII	Grande, redondo	No produce halos
rII^-	Pequeño, irregular	Pequeño, irregular

COROLARIO

Para estudiar el proceso de recombinación en fagos, se ponen en contacto los cromosomas parentales en una misma célula hospedadora mediante infección mixta. Los fagos descendientes se analizan y su genotipo se clasifica en parental o recombinante.

El sistema *rII*

Los trabajos de Seymour Benzer en los años cincuenta refinaron el análisis de los cruzamientos con fagos hasta tal punto que podían detectarse frecuencias muy pequeñas de recombinación. Su trabajo condujo a una mayor comprensión de la naturaleza de la estructura fina del gen, que consideraremos detalladamente en el Capítulo 9. La clave de su trabajo fue el desarrollo de un sistema que permitía la selección de recombinantes raros. Dicho sistema utiliza los genes *rII* del fago T4.

Un tipo de fago mutante producía halos muy grandes e irregulares, de modo que llamó a estos fagos **mutantes** *r* (de lisis *rápida*). Benzer analizó genéticamente los mutantes *r* y localizó las mutaciones responsables para el fenotipo *r* en dos loci: *rI* y *rII*. Luego se concentró en los mutantes *rII*.

Fue una propiedad extraordinaria de los mutantes *rII* la que hizo posible el trabajo de Benzer: los mutantes *rII* tienen un espectro de hospedador distinto al de los fagos silvestres. Como hospedadores del fago T4 pueden usarse dos estirpes de *E. coli* diferentes, aunque relacionadas, llamadas B y K(λ). Con ambas bacterias, puede distinguirse entre fagos mutantes *rII* y silvestres. *E. coli* B permite el crecimiento de ambos, aunque los halos que aparecen son de tamaño distinto: los fagos silvestres producen halos pequeños y los mutantes *rII* producen halos grandes. *E. coli* K, abreviación de *E. coli* K(λ), no permite el crecimiento de los mutantes *rII*, pero sí el de los fagos silvestres. Los mutantes *rII* son **mutantes condicionales**, es decir, mutantes que pueden crecer en una serie de condiciones, pero no en otras. Se dice que *E. coli* B es **permisiva** para los mutantes *rII*, porque permite su multiplicación, mientras que *E. coli* K se considera **no permisiva** para dichos mutantes, porque no permite su multiplicación. El Cuadro 7-4 muestra las características de crecimiento y morfología del halo de estos fagos en cada estirpe hospedadora.

Sistemas de selección en cruzamientos genéticos con fagos

Benzer cruzó varios mutantes *rII* del fago T4 y calculó las frecuencias de recombinación, que utilizó posteriormente para localizar las mutaciones en la región del gen *rII*.

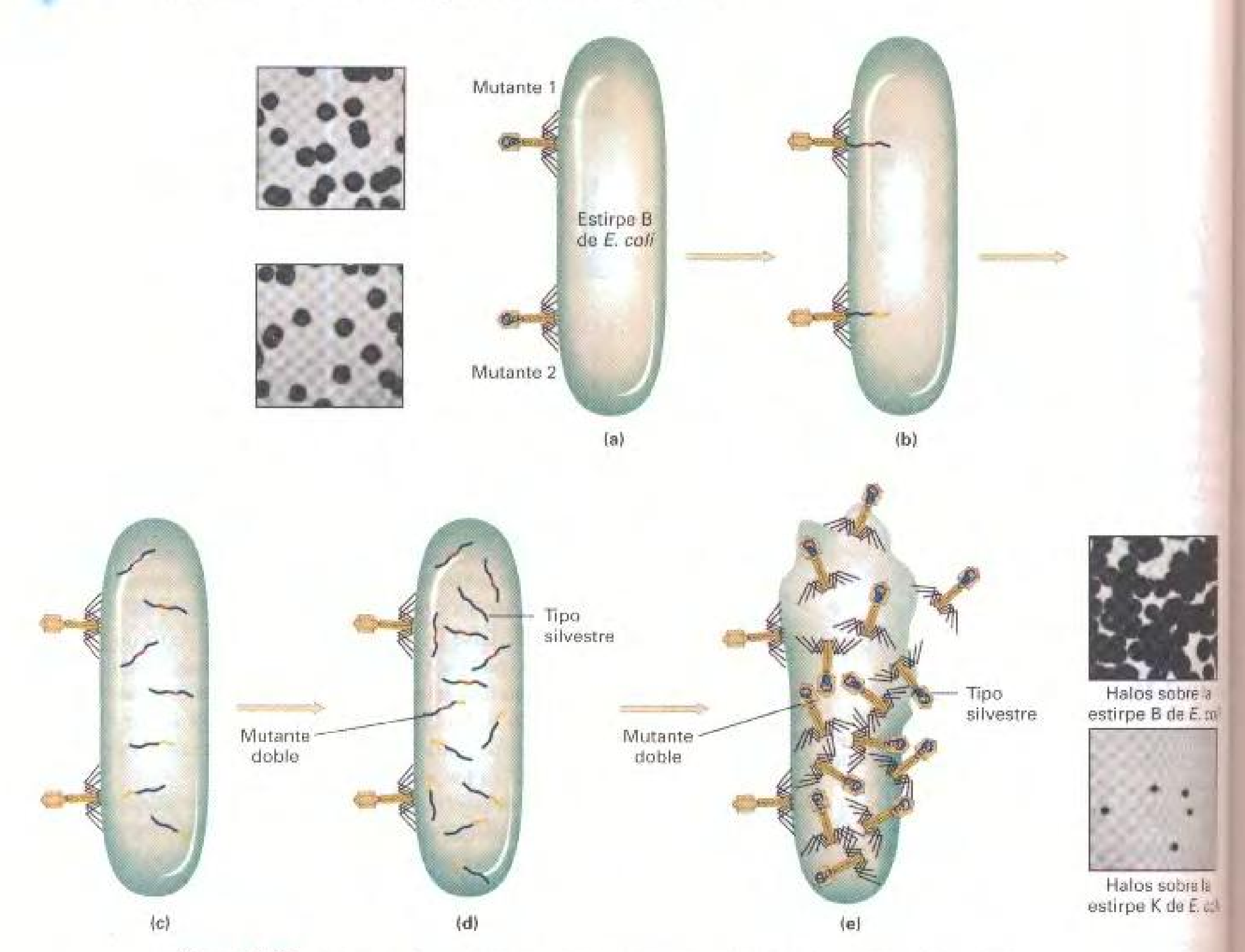


Figura 7-25. El proceso de recombinación permite que fragmentos de DNA de dos mutantes de fagos diferentes se combinen en una nueva molécula de DNA, que puede contener las mutaciones de ambos fagos o ninguna de ellas. Los mutantes obtenidos de los diferentes cultivos se mezclan con un cultivo de la estirpe B de *E. coli*. El cruzamiento ocurre cuando el DNA de cada uno de los fagos mutantes infecta a un solo bacilo. La mayoría de las réplicas de DNA son similares a un tipo de fago o al otro, pero, en ocasiones, la recombinación genera un mutante doble o un recombinante de tipo silvestre, que no contiene ninguna mutación. Al sembrar la descendencia de cada cruzamiento sobre la estirpe B, todos crecen con éxito, produciendo muchos halos. Al sembrar sobre la estirpe K, sólo los recombinantes del tipo silvestre son capaces de crecer. Puede detectarse un solo recombinante silvestre entre unos 100 millones de descendientes. (De S. Benzer, «The Fine Structure of the Gene.» Copyright © 1962. Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.)

Veamos cómo se realiza esto. Supongamos que deseamos cruzar dos mutantes *rII* y recuperar fagos recombinantes silvestres. Ya que tanto los fagos silvestres como los mutantes *rII* forman halos distinguibles unos de otros, podemos cruzar dos mutantes *rII* distintos en *E. coli* B y examinar su descendencia sobre la propia estirpe *E. coli* B (Fig. 7-25, fotografía superior de la derecha), esperando encontrar algún halo pequeño silvestre entre los halos parentales grandes *rII*. Si la frecuencia de recombinación es suficiente para producir un número de halos silvestres del orden del 2 al 3 % o más, este procedimiento bastaría. Sin embargo, si la recombinación fuera menor del 1 %, el trabajo necesario para elaborar el mapa de muchas mutaciones *rII* sería abrumador.

No obstante, en vez de sembrar los fagos descendientes del cruzamiento en *E. coli* B, podríamos sembrarlos en *E. coli* K(λ) (Fig. 7-25, fotografía inferior de la derecha), en la cual sólo crecerían los fagos recombinantes silvestres. Así detectaríamos los fagos recombinantes con toda facilidad, incluso si la frecuencia de recombinación fuera muy baja (digamos, 0.01 %) ¿Por qué? Porque un lisado de fagos (mezcla de fagos producida tras la lisis de las bacterias) típico de tales infecciones (esté o no implicado un cruzamiento) contiene más de 10^9 fagos por mililitro. Si mezclamos 0.1 mL de dicho lisado con 0.1 mL de bacterias *E. coli* K, y la frecuencia de recombinación es del 0.01 %, tendremos más de 10^5 (100 000) fagos silvestres recombinantes que han infectado a las bacterias. (En la práctica, se emplean diluciones crecientes del lisado de fagos hasta que se produzca un número de halos fácilmente cuantificable). De esta manera, podemos darnos perfecta cuenta del poder de resolución del sistema

rII-E. coli B/K. En un solo mililitro podemos encontrar un recombinante o revertiente entre 10^9 individuos. ¡Compare esto con el intento de encontrar un recombinante entre 10^9 moscas *Drosophila* o 10^9 ratones!

Una vez realizado el cruce, necesitamos determinar la frecuencia de recombinación. Para ello, en primer lugar, contamos el número de partículas víricas activas, o unidades formadoras de halos (**ufh**) que crecen sobre *E. coli* K (recuerde que éstos son sólo fagos recombinantes silvestres) y sobre *E. coli* B (éstos representan el total de los fagos descendientes, puesto que todas las partículas víricas crecen en la estirpe B). La frecuencia de recombinación puede calcularse dividiendo el doble del número de ufh sobre *E. coli* K por el número de ufh sobre *E. coli* B ¿Por qué usamos el doble de ufh sobre *E. coli* K? Para tener en cuenta los recombinantes que son mutantes dobles y que no se detectan; dichos mutantes deben estar presentes en la misma proporción que los recombinantes silvestres.

Finalmente, en un cruzamiento de este tipo es necesario sembrar por separado cada lisado parental sobre *E. coli* K para determinar cuántos revertientes silvestres había en la población. Las **mutaciones de reversión** ocurren con una frecuencia muy baja, pero real. Es importante calcular esta frecuencia, y compararla con la frecuencia de recombinación calculada, para estar seguro de que tal recombinación ha ocurrido y no se trata simplemente de la reversión de los tipos parentales.

En resumen, el uso que dio Benzer al sistema *rII* y a dos hospedadores bacterianos distintos le proporcionó un método de selección de hechos poco frecuentes, evitando el escrutinio de gran número de halos.

COROLARIO

Benzer rentabilizó el fantástico poder de resolución derivado del empleo de un método de selección para acontecimientos poco frecuentes en fagos que se multiplican rápidamente. Esto le permitió cartografiar un gen con detalle a escala molecular.

Transducción

Algunos fagos son capaces de movilizar genes bacterianos y transferirlos de unas bacterias a otras por medio de un proceso denominado *transducción*. Por tanto, la transducción constituye un mecanismo de transferencia genética entre bacterias, adicional a los que ya hemos considerado: la conjugación, la transferencia infecciosa de episomas y la transformación.

Descubrimiento de la transducción

En 1951, Joshua Lederberg y Norton Zinder estudiaban procesos de recombinación en la bacteria *Salmonella typhimurium*, aplicando las técnicas que ya habían sido utilizadas eficazmente en *E. coli*. Estos investigadores utilizaron dos estirpes diferentes: una de ellas era de genotipo *phe⁻ trp⁻ tyr⁻* y la otra era *met⁻ his⁻* (no nos preocuparemos de momento sobre la naturaleza de estos marcadores, sólo tendremos en cuenta que los alelos mutantes confieren auxotrofía). Cuando cualquiera de las dos estirpes se sembraba en placas de medio mínimo, no se observaban células silvestres. Sin embargo, tras mezclar las dos estirpes, aparecían células silvestres en una frecuencia aproximada de 1 de cada 10^5. Hasta ahora, la situación parece similar a la recombinación en *E. coli*.

Sin embargo, en este caso también obtuvieron recombinantes en un experimento con un tubo en U, en el que el filtro impedía el contacto celular (conjugación). Variando el tamaño de poro del filtro que separaba los dos brazos, encontraron que el agente responsable de la recombinación tenía un tamaño parecido al del virus P22, un fago atemperado de *Salmonella*. Estudios adicionales reforzaron la idea de que el vector que permitía la recombinación era efectivamente el fago P22. El agente filtrable y P22 tienen propiedades idénticas en lo que respecta a tamaño, sensibilidad a antisueros e inmunidad a enzimas hidrolíticas. De este modo, Lederberg y Zinder, en lugar de confirmar la conjugación en *Salmonella*, descubrieron un nuevo tipo de transferencia genética mediada por virus que denominaron **transducción**. Durante el ciclo lítico, algunas partículas víricas incorporan genes bacterianos que más tarde son transferidos a otro hospedador, donde el virus introduce su contenido. Posteriormente, se ha demostrado que la transducción es bastante común tanto en los fagos atemperados como en los virulentos.

Hay dos tipos de transducción: generalizada y especializada. Los fagos de transducción *generalizada* pueden transferir cualquier parte del cromosoma de la bacteria que infectan, mientras que los fagos de transducción *especializada* únicamente llevan consigo partes específicas del cromosoma bacteriano.

Transducción con fagos y transducción generalizada

¿Cómo se originan los fagos transductores? En 1956, K. Ikeda y J. Tomizawa clarificaron esta cuestión realizando unos experimentos con el fago P1, un fago atemperado de *E. coli*. Observaron que cuando una célula donante no lisogénica se lisaba como consecuencia de una infección por P1, el cromosoma bacteriano se rompía en fragmentos pequeños. Ocasionalmente, las partículas de fago en formación empaquetaban accidentalmente DNA bacteriano en la cápsida en lugar del DNA del fago, dando origen al fago transductor.

Debido a que las proteínas de la cápsida determinan la capacidad del fago para atacar a una célula, tales fagos transductores pueden adsorberse a la célula bacteriana e inyectar su contenido, que en este caso son genes bacterianos donantes. Cuando se inyecta el contenido de un fago transductor al interior de una célula recipiente, se crea una situación de meroploidía en la cual los genes transducidos pueden incorporarse por recombinación (Fig. 7-26). Puesto que puede transducirse cualquier marcador de la célula hospedadora, este tipo de transducción se denomina **transducción generalizada**.

Los fagos P1 y P22 pertenecen a un grupo que muestra transducción generalizada (es decir, transfieren prácticamente cualquier gen del cromosoma hospedador). Durante su ciclo de vida, P22 probablemente se inserta en el cromosoma hospedador en forma de profago, mientras que P1 permanece independiente como un gran plásmido, pero ambos fagos son capaces de transducir marcadores por empaquetamiento erróneo de la cápsida durante la lisis.

Bacteria donante

Fagos portadores de genes del donante

Bacteria transducida

Bacteria receptora

Figura 7-26. Mecanismo de transducción generalizada. En realidad, sólo una pequeña proporción de los fagos descendientes (1 de cada 10 000) contiene genes de la estirpe donante.

Análisis de ligamiento mediante experimentos de transducción

La transducción generalizada puede utilizarse para obtener información del ligamiento entre genes bacterianos si tales genes están suficientemente cercanos para que el fago pueda incorporarlos y transducirlos como un solo fragmento de DNA. Por ejemplo, supongamos que queremos medir el grado de ligamiento entre los loci *met* y *arg* de *E. coli*. Realizamos un cruzamiento entre una estirpe met^+ arg^+, y otra met^- arg^-. Podemos incubar el fago P1 con la estirpe donante met^+ arg^+, permitir la infección con P1 de la estirpe met^- arg^-, y seleccionar luego las colonias met^+. Determinaríamos entonces qué porcentaje de las colonias met^+ son también arg^+. Las estirpes que han sido transducidas tanto para met^+ como para arg^+, se denominan **cotransductantes**.

El grado de ligamiento se expresa como frecuencias de cotransducción (Fig. 7-27). Cuanto mayor sea la frecuencia de cotransducción, menor será la distancia entre los dos marcadores genéticos.

En una extensión de este análisis, podemos estimar el tamaño del fragmento cromosómico que es capaz de incorporar un fago, realizando el siguiente tipo de experimento con el fago P1:

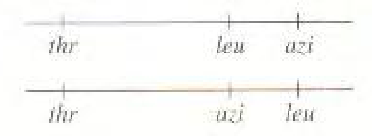
$$\text{Donante } leu^- \; thr^+ \; azi^r \longrightarrow \text{recipiente } leu^- \; thr^- \; azi^s$$

Podemos seleccionar uno o más marcadores del donante en el recipiente y después (siguiendo la metodología de la genética de la merocigosis) buscar la presencia de los otros marcadores no seleccionados, tal como se indica en el Cuadro 7-5.

CUADRO 7-5. Marcadores asociados en transducciones concretas con P1

Experimento	Marcador seleccionado	Marcadores no seleccionados
1	leu^+	50 % son azi^r; 2 % son *thr*
2	thr^+	3 % son leu^+; 0 % son *azi*
3	leu^+ y thr^+	0 % son azi^r

El experimento 1 de el Cuadro 7-5 nos dice que *leu* está relativamente cerca de *azi* y lejos de *thr*, dejándonos con dos alternativas posibles:



El experimento 2 nos dice que *leu* está más cerca de *thr* que *azi*, por lo que el mapa debe ser:



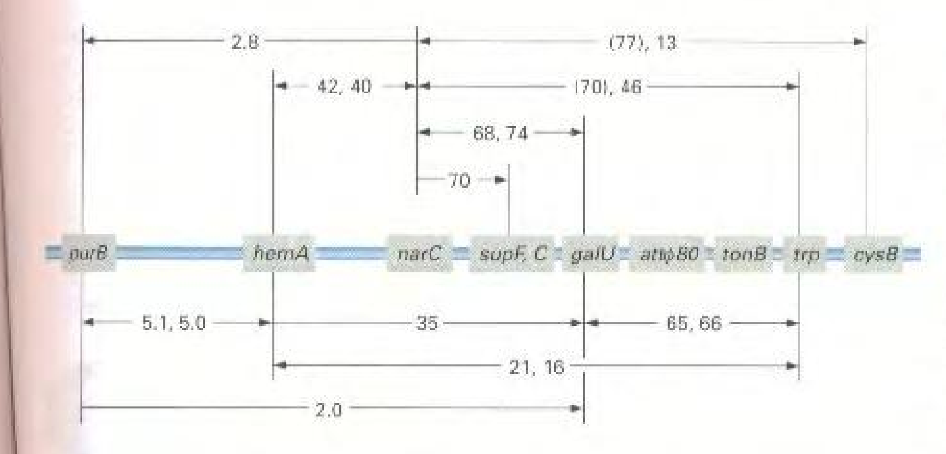


Figura 7-27. Mapa genético de la región *purB-cysB* de *E. coli* determinado por experimentos de cotransducción con P1. Los números son las medias en tanto por ciento de las frecuencias de cotransducción obtenidas en varios experimentos. En los casos en que se realizaron cruzamientos en ambos sentidos, la punta de cada flecha señala el marcador seleccionado con el ligamiento correspondiente más próximo a cada flecha. Los valores entre paréntesis no se consideran fiables debido a la interferencia del marcador no seleccionado. (Modificado de J. R. Guest, *Molecular and General Genetics* 105, 1969, 285.)

El experimento 3, en el que se seleccionaron los marcadores thr^+ y leu^+, indica que el fragmento de material genético transducido no incluye nunca el locus *azi*.

Si estudiáramos un número suficiente de marcadores para producir un mapa de ligamiento más completo, podríamos estimar el tamaño del fragmento transducido. Este tipo de experimentos indica que en P1 la cotransducción es posible para una distancia de aproximadamente 1.5 minutos en el mapa cromosómico de *E. coli* (1 minuto equivale a la longitud de cromosoma transferida por una estirpe Hfr en un minuto a 37 °C).

Lisogenia

En los años veinte, mucho antes de que *E. coli* se convirtiera en el organismo favorito de los genetistas microbianos, se obtuvieron algunos resultados interesantes mediante el estudio de la infección de *E. coli* por fagos. Algunas estirpes bacterianas son resistentes a la infección por ciertos fagos, pero causan la lisis de bacterias no resistentes si las dos estirpes bacterianas se mezclan. Las bacterias resistentes que inducen la lisis de otras células se denominan bacterias lisogénicas o lisógenos. Cuando se infectan bacterias no lisogénicas con fagos derivados de una estirpe lisogénica, una pequeña parte de las células infectadas no se lisa, sino que se convierte en lisogénica.

Aparentemente, las bacterias lisogénicas son de algún modo «portadoras» de fagos aunque ellas mismas son inmunes a su acción lítica. En un principio, se prestó poca atención a este fenómeno, después de que algunos estudios sugirieran que las bacterias lisogénicas estaban simplemente contaminadas con fagos externos que podían eliminarse tras purificación cuidadosa. Sin embargo, a mediados de los años cuarenta, André Lwoff estudió estirpes lisogénicas de *Bacillus megaterium* y siguió el comportamiento de una estirpe lisogénica a lo largo de muchas divisiones celulares. Observando cuidadosamente este cultivo, separó cada par de células hijas inmediatamente después de la división. Una de las células la puso en un cultivo y a la otra la observó cada vez que se dividió. De este modo, obtuvo 19 cultivos que representaban 19 generaciones (19 divisiones celulares consecutivas). Los 19 cultivos eran lisogénicos, pero los análisis del medio no revelaron ningún fago libre en ningún momento durante las divisiones, confirmando así que el comportamiento lisogénico era un carácter que persistía tras la reproducción en ausencia de fagos libres.

Con baja frecuencia, Lwoff observó lisis espontánea de alguna de las células de sus cultivos. Si se extendía el medio sobre un césped de células no lisogénicas después de una de estas lisis espontáneas, aparecían halos, indicando que se habían liberado fagos durante la lisis. Lwoff propuso una hipótesis para explicar todas estas observaciones: cada una de las bacterias de la estirpe lisogénica contiene un factor no infectivo que se transmite de generación en generación, pero ocasionalmente este factor da lugar a la producción de fagos infectivos (sin la presencia de fagos libres en el medio). Lwoff denominó **profago** a este factor, porque de algún modo parecía ser capaz de *inducir* la formación de una descendencia de fagos infectivos. Estudios posteriores revelaron que hay varios agentes, tales como la luz ultravioleta o determinados productos químicos, que pueden inducir la lisis de una proporción elevada de células en una población de bacterias lisogénicas.

Ahora estamos en disposición de comprender completamente las observaciones de Lwoff. Una bacteria lisogénica contiene un profago, que de algún modo protege a la célula contra una infección adicional, o **sobreinfección**, por fagos libres y se duplica durante la división, trasmitiéndose a las células hijas. En una proporción pequeña de las células lisogénicas, el profago se **induce**, o **activa**, para producir fagos infectivos. Este proceso termina con la protección de la célula contra el fago, por lo que aquélla se lisa y libera fagos infectivos al medio, infectando así cualquier célula no lisogénica presente en el cultivo.

Los fagos se clasifican en dos grupos. Los **fagos virulentos** presentan un ciclo infeccioso que siempre es **lítico**: no hay bacterias lisogénicas para estos fagos (puede que existan mutantes bacterianos resistentes a los fagos virulentos, pero la resistencia no se debe a la lisogenia). Los **fagos atemperados** siguen un ciclo lítico en determinadas circunstancias, pero normalmente inician un **ciclo lisogénico**, en el cual el fago se mantiene en la célula bacteriana como un profago. En este caso, la bacteria lisogénica se hace resistente a una nueva infección, «inmunidad» que es conferida por la presencia del profago y que se transmite durante muchas generaciones bacterianas. Los fagos atemperados también producen lisis cuando el profago es inducido, o activado. La Figura 7-28 representa los ciclos lítico y lisogénico de un fago atemperado típico.

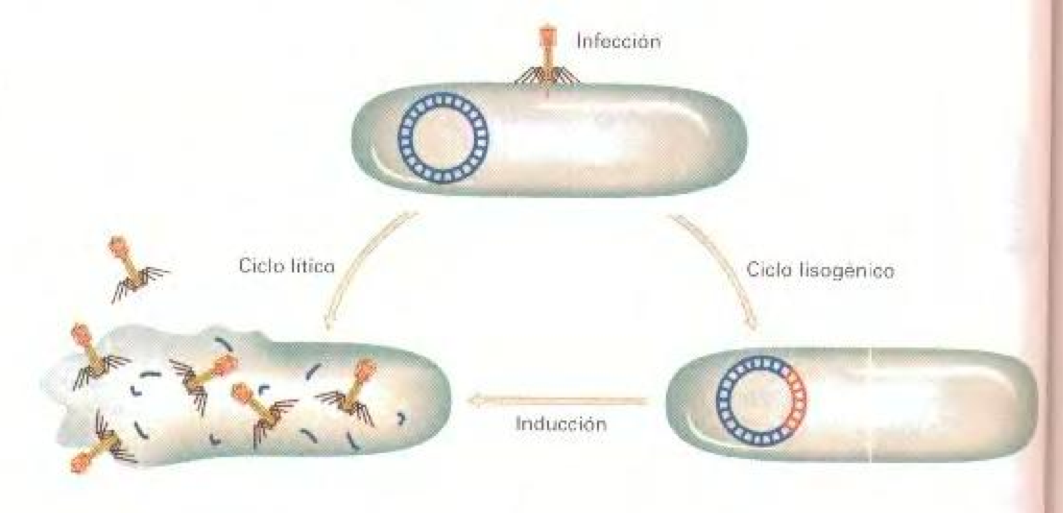


Figura 7-28. Ciclos de vida alternativos de un fago atemperado y su célula hospedadora. (De A. Lwoff, *Bacteriological Reviews* 17, 1953, 269.)

COROLARIO

Los fagos virulentos no pueden convertirse en profagos; son siempre líticos. Los fagos atemperados pueden permanecer en la célula bacteriana en forma de profagos, permitiendo a las células hospedadoras sobrevivir como bacterias lisogénicas, aunque también son capaces de provocar la lisis bacteriana.

Base genética de la lisogenia

¿Cuál es la naturaleza del profago? Tras la inducción, el profago es capaz de dirigir la producción de fagos maduros completos, de modo que todo el genoma del fago debe estar presente en el fago. Pero, ¿es el fago una partícula pequeña que se encuentra libre en el citoplasma bacteriano, o está de algún modo asociado al genoma bacteriano? Casualmente, la estirpe original de *E. coli* utilizada por Lederberg y Tatum (pág. 209) resultó ser lisogénica para un fago atemperado denominado **lambda** (λ). El fago λ se ha convertido en el fago más estudiado y mejor caracterizado. Los cruzamientos entre células F^+ y F^- han proporcionado resultados interesantes. El cruzamiento $F^+ \times F^-(\lambda)$ produce receptores recombinantes lisogénicos, mientras que el cruzamiento recíproco $F^+(\lambda) \times F^-$, casi nunca produce recombinantes lisogénicos.

Estos resultados se hicieron más comprensibles cuando se descubrieron las estirpes Hfr. En el cruzamiento Hfr $\times F^-(\lambda)$, se obtienen fácilmente exconjugantes lisogénicos F^- con genes Hfr. Sin embargo, en el cruzamiento recíproco Hfr(λ) $\times F^-$, entre los exconjugantes aparecen los primeros genes que se transfieren a partir del cromosoma Hfr, pero no se observan recombinantes para los marcadores tardíos (aquellos que se transfieren después de cierto tiempo de iniciada la conjugación). Además, casi nunca se obtienen exconjugantes lisogénicos en este cruzamiento recíproco. ¿Cómo podrían explicarse estos resultados? Estas observaciones tendrían sentido si el profago λ se comportara como un locus genético bacteriano (es decir, como parte del cromosoma bacteriano). En experimentos de conjugación interrumpida, el profago λ siempre entra en la célula F^- en un momento específico, estrechamente ligado al locus *gal*. Por tanto, podemos situar el profago λ en un locus concreto próximo a la región *gal*.

En el cruzamiento entre una estirpe Hfr lisogénica y una estirpe recipiente F^- no lisogénica (no inmune), la entrada del profago λ a la célula no inmune induce el ciclo lítico de inmediato, proceso denominado **inducción cigótica**. Sin embargo, en el cruzamiento Hfr(λ) $\times F^-(\lambda)$, se obtiene fácilmente cualquier tipo de recombinante; es decir, no hay inducción del profago y en consecuencia no se produce lisis (Fig. 7-29). Parece como si el citoplasma de la célula F^- pudiera encontrarse en dos estados diferentes (dependiendo de si la célula contiene o no un profago de λ), de manera que el contacto entre un profago entrante y el citoplasma de una célula no inmune induciría inmediatamente el ciclo lítico. Ahora sabemos que un factor citoplásmico determinado por el profago reprime la multiplicación del virus. La entrada del profago en un ambiente no lisogénico diluye inmediatamente este factor represor y entonces el virus se reproduce. Pero si el virus determina el factor represor, ¿por qué no se reprime a sí mismo? Claramente lo hace, porque una fracción de

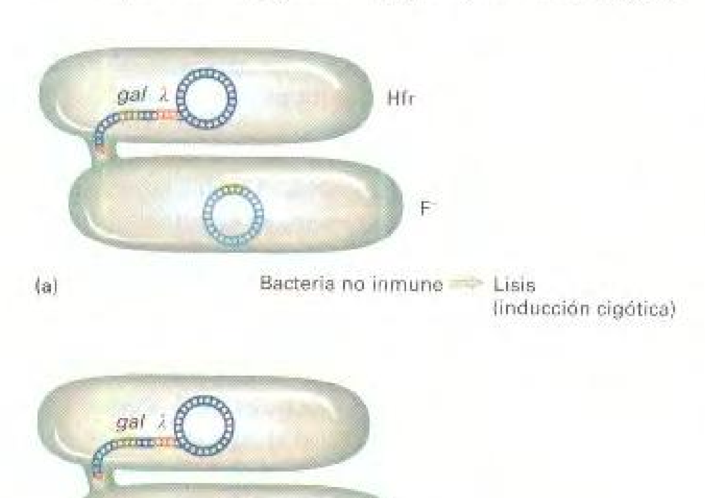


Figura 7-29. Inducción cigótica.

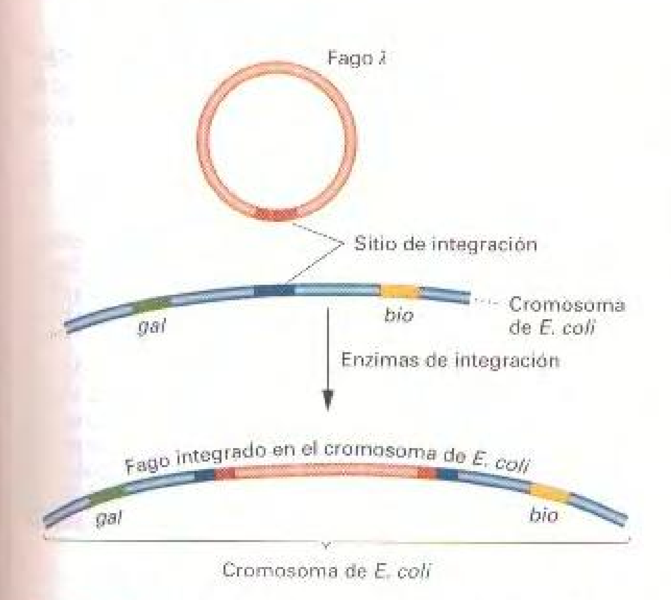


Figura 7-30. Modelo de Campbell de integración del fago λ en el cromosoma de *E. coli*. Se produce un hecho de recombinación recíproco entre un sitio de integración específico presente en el DNA circular de λ y una región concreta del cromosoma de la bacteria situada entre los genes *gal* y *bio*.

células infectadas se convierte en lisogénica. Se produce una competencia entre las señales génicas de λ necesarias para la reproducción y aquellas necesarias para la represión. El modelo de un represor citoplásmico determinado por el fago explica la inmunidad de las bacterias lisogénicas, ya que cualquier fago infectante nuevo encontraría inmediatamente un represor y sería inactivado. En el Capítulo 11 discutiremos con más detalle este modelo.

Integración del profago

¿Cómo se integra el profago en el genoma de una bacteria? Allan Campbell propuso en 1962 que λ lo hace mediante un hecho de recombinación recíproca entre los cromosomas circulares de λ y de *E. coli*, como se muestra en la Figura 7-30. El entrecruzamiento ocurre entre una región específica de λ, el **sitio de integración de λ**, y una región del cromosoma bacteriano situada entre los genes *gal* y *bio*, ya que λ se integra en esa posición en el cromosoma de *E. coli*.

Un aspecto atractivo del modelo de Campbell es que permite hacer predicciones que pueden ser comprobadas por los genetistas utilizando el fago λ:

1. La integración del profago en el cromosoma de *E. coli* debería provocar un aumento en la distancia genética entre los marcadores bacterianos adyacentes, como se aprecia en la Figura 7-30 para *gal* y *bio*. De hecho, los estudios demuestran que el tiempo de entrada y las distancias de recombinación entre los genes bacterianos *aumentan* como consecuencia de la lisogenia.
2. La deleción de fragmentos bacterianos adyacentes al sitio de integración del profago deberían delecionar genes del fago, al menos algunas veces. Los estudios experimentales también confirman esta predicción.

Transducción especializada

Ahora podemos comprender el proceso de **transducción especializada**, mediante el cual sólo pueden transducirse ciertos marcadores de la célula hospedadora.

El fago lambda es un buen ejemplo de fago transductor especializado. Como profago, λ siempre se integra entre las regiones *gal* y *bio* del cromosoma del hospedador (véase Fig. 7-30). En experimentos de transducción, λ sólo transduce los genes *gal* y *bio*. Visualicemos el mecanismo de transducción de λ.

La recombinación entre regiones de λ y del cromosoma bacteriano está catalizada por un sistema enzimático específico. Dicho sistema normalmente asegura que λ se integre siempre en el

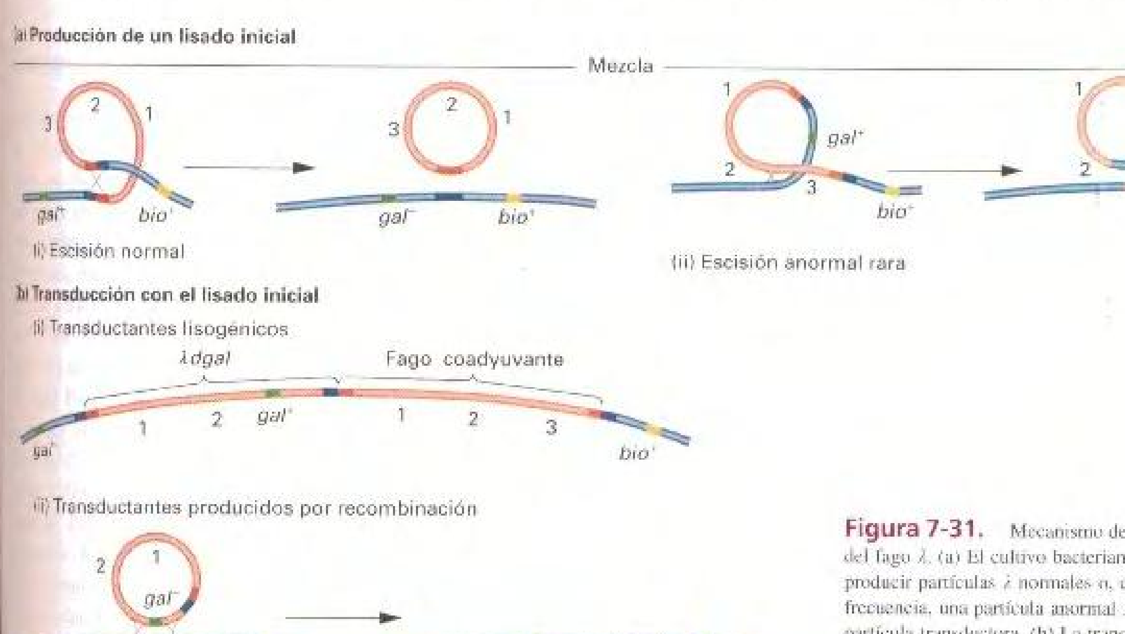


Figura 7-31. Mecanismo de transducción especializada del fago λ. (a) El cultivo bacteriano lisogénico puede producir partículas λ normales o, con muy baja frecuencia, una partícula anormal *λdgal*, que es una partícula transductora. (b) La transducción con ese lisado mixto puede producir transductantes gal^+ por la incorporación simultánea de *λdgal* y un fago λ silvestre.

mismo sitio del cromosoma y cuando se induce el ciclo lítico (por ejemplo, con luz ultravioleta), asegura que el profago λ se separe de modo preciso en el sitio correcto para dar lugar al cromosoma normal y circular de λ. Con muy baja frecuencia, se produce una escisión anormal del profago, dando lugar a partículas del fago portadoras de un gen próximo al sitio de integración y dejando atrás algunos genes del fago (Fig. 7-31*a*). Los genes adyacentes en el caso del fago λ, son *gal* a un lado y *bio* al otro. Las partículas resultantes son defectuosas, ya que algunos de sus genes han quedado en el cromosoma del hospedador y, por ello, se denominan ***λdgal*** (*λ*-defectuoso *gal*), o ***λdbio***. Estas partículas defectuosas portadoras de genes adyacentes pueden empaquetarse en las cápsidas de los fagos e infectar a otras bacterias. En presencia de una segunda partícula de fago silvestre, mediante una infección doble, la partícula ***λdgal*** puede integrarse en el sitio de integración de λ del cromosoma (Fig. 7-31*b*). De este modo, los genes *gal* se transducen en este caso a una segunda célula hospedadora. Este mecanismo de transducción se denomina transducción especializada, porque se limita a genes que están muy próximos al profago integrado inicialmente.

COROLARIO

La transducción se produce cuando los fagos que se están formando incorporan genes del hospedador y los transfieren a otras células bacterianas. En la *transducción generalizada*, el fago puede transferir cualquier gen del hospedador. Ocurre cuando los fagos que están empaquetándose incorporan accidentalmente DNA bacteriano en lugar de su propio DNA vírico. La *transducción especializada* se debe a una escisión defectuosa del profago del cromosoma bacteriano, de modo que el nuevo fago incluye tanto genes bacterianos como genes del propio fago. Estos fagos transductores sólo pueden transferir genes específicos del hospedador.

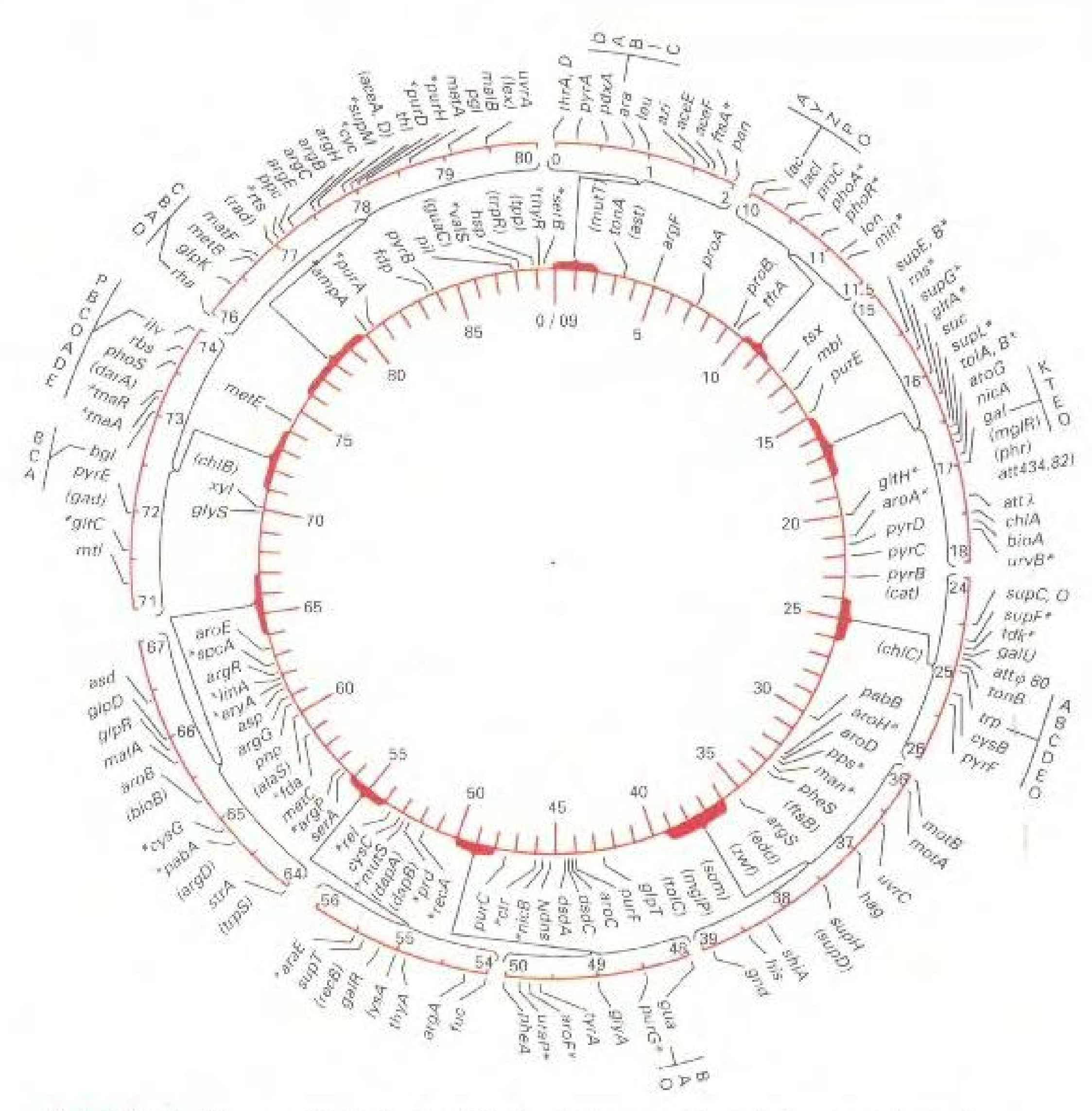


Figura 7-32. El mapa genético de *E. coli* de 1963. Las unidades son los minutos, basadas en experimentos de conjugación interrumpida y medidas a partir de un origen localizado arbitrariamente. Los asteriscos hacen referencia a los marcadores que no han sido localizados en el mapa con tanta precisión como los demás. (De G. S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Copyright © 1963, W. H. Freeman and Company.)

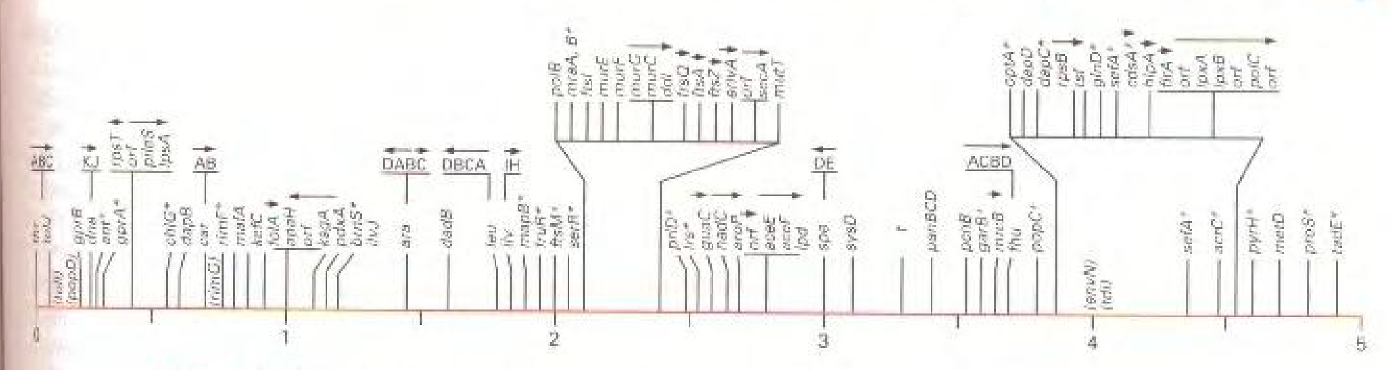


Figura 7-33. Representación lineal de una sección de 5 minutos del mapa de ligamiento de 100 minutos de *E. coli* de 1990. Los marcadores entre paréntesis no están cartografiados de forma precisa; aquellos marcados con asteriscos están cartografiados de forma más precisa que los que están entre paréntesis, pero todavía no se conocen exactamente. Las flechas sobre los genes y agrupaciones de genes indican la dirección de transcripción de esos loci. (De B. J. Bachmann, «Linkage Map of *Escherichia coli* K-12, Ed. 8.» *Microbiological Reviews*, 54, 1990, 130-197).

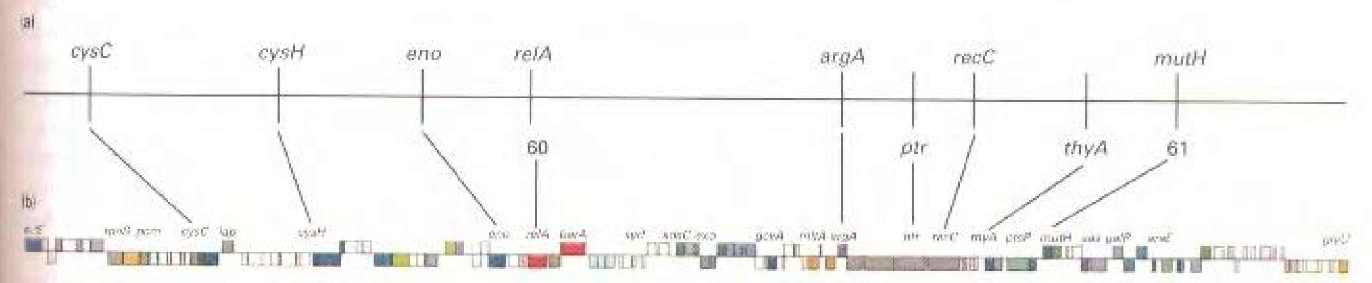


Figura 7-34. Correlación entre los mapas genético y físico. (a) Marcadores del mapa genético de 1990 en la región próxima a los minutos 60 y 61. (b) Posición exacta de cada gen, basada en la secuencia completa del genoma de *E. coli*. (Por simplicidad, no aparecen todos los genes en la figura). Los cuadrados pequeños representan genes y supuestos genes. Cada color representa un tipo de función diferente. Por ejemplo, el rojo denota una función reguladora y el azul oscuro denota las funciones de replicación, recombinación y reparación del DNA. Se indica la correspondencia del orden de los genes en los dos mapas.

Cartografía del cromosoma

Combinando las técnicas de conjugación interrumpida, análisis de ligamiento por recombinación, transformación y transducción, se han elaborado algunos mapas cromosómicos bacterianos muy detallados. Actualmente, los marcadores genéticos nuevos suelen localizarse primero en un segmento de unos 10 a 15 minutos, utilizando para ello una serie de estirpes Hfr que transfieren DNA a partir de diferentes puntos a lo largo del cromosoma. Esto permite seleccionar marcadores dentro del intervalo, que son utilizados luego en experimentos de cotransducción con el fago P1.

En el año 1963, el mapa de *E. coli* (Fig. 7-32) ya detallaba las posiciones de aproximadamente 100 genes. Tras 27 años de refinamiento posterior, el mapa de 1990 indica la posición de más de 1400 genes. La Figura 7-33 muestra una porción de 5 minutos del mapa de 1990 (que está ajustado a una escala de 100 minutos). La complejidad de estos mapas ilustra el poder de resolución y la sofisticación del análisis genético. ¿Hasta qué punto estos mapas corresponden a la realidad física? En 1997, se obtuvo la secuencia de DNA del genoma completo de *E. coli*, permitiendo así comparar la posición exacta de los marcadores del mapa genético con la posición correspondiente a la secuencia lineal de DNA respectiva en la que están cifrados. La Figura 7-34 muestra la comparación de un segmento en ambos mapas. Claramente, el mapa genético corresponde de manera precisa a las posiciones relativas del mapa físico.

Revisión de la transferencia génica bacteriana

1. La transferencia de genes entre bacterias puede llevarse a cabo mediante conjugación, transformación y transducción mediada por fagos.

2. La herencia de marcadores genéticos mediante transferencia conjugativa de DNA por estirpes Hfr, transformación de segmentos del cromosoma donante y transducción generalizada son procesos que comparten una propiedad importante. En todos estos procesos, se introduce un fragmento de DNA

en la célula receptora, que debe sufrir dos hechos de recombinación para que sea integrado en el cromosoma y heredado posteriormente. Los fragmentos que no se incorporen, no pueden replicarse y por consiguiente, se diluyen y desaparecen de la población de células hijas.

3. La transferencia conjugativa de factores F′ portadores de genes bacterianos y la transducción especializada de ciertos marcadores genéticos son procesos similares en el sentido de que en ambos casos se introduce eficazmente un conjunto limitado y específico de genes bacterianos en la célula recipiente. Para su transmisión no es necesario que ocurra recombinación normal, como en el caso de la herencia de fragmentos de DNA. Después de la transferencia de F′, el factor F′ se replica en el citoplasma bacteriano como una entidad separada. Por otro lado, el DNA del fago transductor especializado se integra en el cromosoma bacteriano mediante un sistema de recombinación específico de ese fago. En ambos casos, se produce un diploide parcial (merodiploide), ya que los dos procesos permiten la herencia simultánea del gen transferido y del alelo correspondiente en la célula recipiente.

4. La transferencia génica puede utilizarse para cartografiar el cromosoma bacteriano. Los cruzamientos con estirpes Hfr se utilizan primero para localizar una mutación en una región determinada del cromosoma. Posteriormente, la transducción generalizada proporciona una localización más precisa.

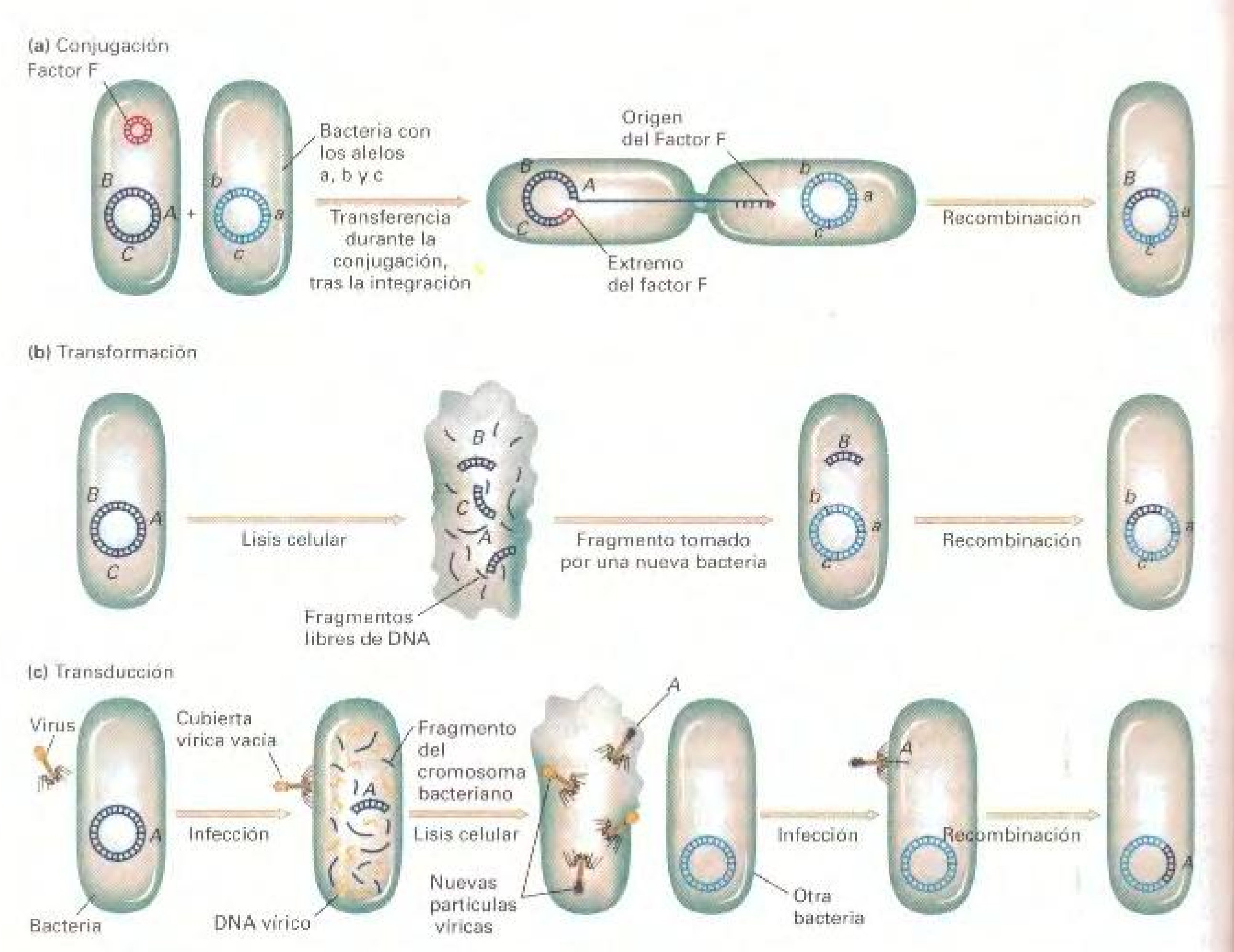


Figura 7-35. Procesos de recombinación en bacterias. La recombinación bacteriana requiere que una célula reciba un alelo de otra célula. (a) En el proceso de conjugación, un elemento citoplásmico, como el factor de fertilidad (F), se integra en el cromosoma de la célula bacteriana. Durante el contacto célula-célula, el factor integrado puede transferir todo o parte de ese cromosoma a otra célula cuyo cromosoma contenga alelos de los genes presentes en el fragmento transferido. Éste recombina con el segmento homólogo del cromosoma de la célula receptora, en el ejemplo mostrado aquí, el alelo *B* sustituye al alelo *b*. (b) En el proceso de transformación, un segmento de DNA portador de un determinado alelo es captado del medio ambiente por una célula cuyo cromosoma lleva un alelo con el que puede emparejar; los alelos (en nuestro ejemplo, *B* y *b*) se intercambian por recombinación homóloga. (c) En el proceso de transducción, después de que un fago haya infectado a una célula bacteriana, una de las partículas del fago sintetizadas *de novo* toma un segmento de DNA bacteriano en lugar del DNA vírico. Cuando esta partícula infecta a otra célula, inyecta el DNA bacteriano, que recombina con un segmento homólogo de la segunda célula, produciéndose así el intercambio de cualquiera de los alelos correspondientes (en nuestro ejemplo, *A* y *a*).

RESUMEN

El progreso conseguido en los últimos cincuenta años ha servido de base para los recientes avances realizados en el campo de la Genética molecular (que se discuten en los siguientes capítulos). En los primeros momentos de este período, se descubrió que la transferencia genética y la recombinación son procesos que ocurren entre distintos tipos de bacterias. En las bacterias, el material genético se transmite en un único sentido, desde una célula donante (F^+ o Hfr) a una célula receptora (F^-). La capacidad de actuar como donante está determinada por la presencia en la célula de un factor de fertilidad (F), que funciona como un episoma.

A veces, el factor F presente en las células F^+ en estado libre puede integrarse en el cromosoma de *E. coli* y dar lugar a una célula Hfr. Cuando esto ocurre, tiene lugar la transferencia de genes bacterianos y la posterior recombinación. Además, como el factor F puede integrarse en sitios diferentes del cromosoma hospedador, los científicos han podido demostrar que el cromosoma de *E. coli* es único y circular. La interrupción de la conjugación a distintos tiempos ha provisto a los genéticos de un método para elaborar mapas de ligamiento del cromosoma de *E. coli* y otras bacterias similares.

También pueden transferirse marcadores genéticos de unas bacterias a otras en forma de DNA desnudo. El estudio del proceso de transformación en bacterias permitió demostrar por primera vez que el DNA es el material genético. Para que se produzca la transformación, el DNA debe ser tomado por una célula receptora, y entonces tener lugar la recombinación entre el DNA incorporado y el cromosoma del receptor.

Las bacterias pueden ser infectadas por bacteriófagos. En una forma de infección, el cromosoma del fago entra en la célula y, utilizando su maquinaria metabólica, produce fagos descendientes, que lisan la bacteria hospedadora. Las nuevas partículas de fagos pueden infectar a otras células. Si dos fagos de genotipos diferentes infectan a un mismo hospedador, durante el proceso lítico puede tener lugar la recombinación de sus cromosomas. La localización de genes siguiendo este método ha llevado a la conclusión de que los cromosomas de los fagos pueden ser también circulares.

En otra forma de infección, la lisogenia, el DNA inyectado del fago permanece latente en la célula hospedadora. En muchos casos, este fago latente (el profago) se integra en el cromosoma hospedador y se replica con él. Bien espontáneamente o bien mediante inducción, el profago puede salir de su latencia y lisar la célula hospedadora.

Los fagos pueden transportar genes bacterianos desde una célula donante a una receptora. En el proceso de transducción generalizada, durante la lisis se empaquetan fragmentos aleatorios de DNA en la cápsida del fago. En la transducción especializada, se incluyen en la cápsida del fago genes específicos del hospedador junto con DNA del fago, debido a la escisión errónea del profago de un locus cromosómico concreto.

La **Figura 7-35** resume los procesos de conjugación, transformación y transducción.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

bacterias / conjugación / recombinación / plásmido F / Hfr / F^- / donante / recipiente / conjugación interrumpida / mapa cromosómico / pilus / merocigoto / gen

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

Suponiendo que una célula es incapaz de llevar a cabo el proceso de recombinación (es rec^-), ¿Cómo se comportaría esta célula como recipiente en transducciones generalizadas y en especializadas? En primer lugar, compare los dos tipos de transducción y luego determine el efecto de la mutación rec^- sobre la transmisión de genes mediante cada proceso.

♦Solución♦

La transducción generalizada implica la incorporación de fragmentos cromosómicos dentro de cápsidas de fagos, que pueden entonces infectar a células receptoras. Los fragmentos del cromosoma son incorporados en las cápsidas de forma aleatoria, de modo que cualquier marcador del cromosoma del hospedador puede ser transducido a otra célula. Por el contrario, en la transducción especializada el fago se integra en un punto específico del cromosoma y hay una incorporación poco frecuente en el genoma del fago de marcadores cromosómicos próximos a ese sitio de integración del fago. Por tanto, sólo podrán ser transducidos aquellos marcadores que se encuentren próximos al sitio de integración específico del fago en el cromosoma del hospedador.

La herencia de marcadores ocurre mediante mecanismos diferentes en la transducción generalizada y en la especializada. Un fago transductor generalizado inyecta un fragmento del cromosoma de la célula donante en el citoplasma de la receptora. Este fragmento tiene que incorporarse al cromosoma receptor por medio de la recombinación, utilizando la maquinaria de recombinación de la bacteria. Por tanto, una bacteria receptora rec^- será incapaz de incorporar fragmentos de DNA, y no podrá heredar marcadores mediante transducción generalizada. En cambio, en el caso de la transducción especializada, el mecanismo principal de herencia de marcadores implica la integración de la partícula transductora en el cromosoma del hospedador, en el sitio de integración específico. Esta integración, que en ocasiones requiere la presencia de un fago auxiliar (coadyuvante), es media-

da por un sistema enzimático determinado por el fago que es independiente de las enzimas de recombinación de la bacteria. Por tanto, una célula recipiente *rec*⁻ puede heredar marcado[res] de otra bacteria por transducción especializada.

PROBLEMAS RESUELTOS

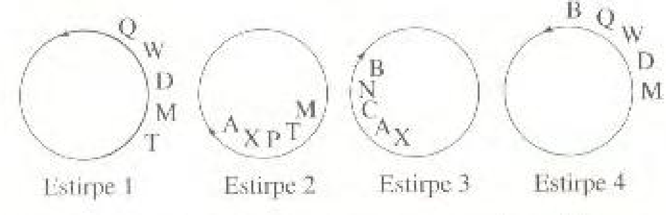
1. Cuatro estirpes Hfr de *E. coli* transfieren los siguientes marcadores genéticos en el orden que se indica:

Estirpe 1:	Q	W	D	M	T
Estirpe 2:	A	X	P	T	M
Estirpe 3:	B	N	C	A	X
Estirpe 4:	B	Q	W	D	M

Las cuatro estirpes derivan de la misma estirpe F^+. ¿Cuál es el orden de estos marcadores en el cromosoma circular de la estirpe F^+ original?

♦ Solución ♦

Recuerde el planteamiento de dos pasos que suele ser muy útil: 1) determine el postulado subyacente, y 2) dibuje un diagrama. Aquí el postulado relevante es que cada estirpe Hfr transfiere marcadores genéticos a partir de un punto fijo del cromosoma circular y que los marcadores más cercanos al origen son los que se transfieren con mayor frecuencia. Ninguna de las estirpes Hfr transfiere todos los marcadores, de manera que sólo se transfieren los marcadores más tempranos. Cada estirpe nos permite establecer las siguientes relaciones circulares de ligamiento:



Estirpe 1 Estirpe 2 Estirpe 3 Estirpe 4

A partir de esta información, podemos construir un único mapa de ligamiento circular con el orden: Q, W, D, M, T, P, X, A, C, N, B, Q.

2. En un cruzamiento Hfr × F^-, el primer marcador que entra es leu^+, pero no se conoce el orden de los marcadores. La Hfr es una estirpe protótrofa y la F^- es auxótrofa para todos los marcadores en cuestión. En el cruzamiento se seleccionan los recombinantes leu^+ ¿cuál es el orden de los marcadores si el 27 % de los recombinantes es ile^+, el 13 % es mal^+, el 82 % es thr^+ y el 1 % es trp^+?

♦ Solución ♦

Recuerde que la rotura espontánea origina un nuevo gradiente de transferencia, que hace que sea cada vez menos probable que una célula recipiente reciba los marcadores más tardíos. Como en este cruzamiento hemos seleccionado el marcador más temprano, la frecuencia de recombinantes está en función del orden de entrada para cada marcador. Por tanto, podemos determinar inmediatamente el orden de los marcadores genéticos simplemente fijándonos en el porcentaje de recombinantes para cualquier marcador entre los recombinantes leu^+. Puesto que thr^+ e[s] el marcador que ha sido heredado mayoritariamente, éste de[be] ser el primer marcador que entra después de *leu*. El orden com[-]pleto sería *leu, thr, ile, mal, trp*.

3. Se realiza un cruzamiento entre una estirpe Hfr met^+ thi^+ pur^+ y una estirpe F^- met^- thi^- pur^-. Experimentos [de] conjugación interrumpida demuestran que met^+ entra en [el] receptor en último lugar, de modo que se seleccionan re[-]combinantes met^+ en un medio que contiene suplemen[tos] que satisfacen sólo los requerimientos de *pur* y *thi*. Se de[-]termina la presencia de los alelos thi^+ y pur^+ en estos re[-]combinantes y se encuentran los siguientes números de ca[da] genotipo:

met^+ thi^+ pur^+	280
met^+ thi^+ pur^-	0
met^+ thi^- pur^+	6
met^+ thi^- pur^-	52

a. ¿Por qué no se añadió metionina (Met) en el medio [de] selección?

b. ¿Cuál es el orden de los genes?

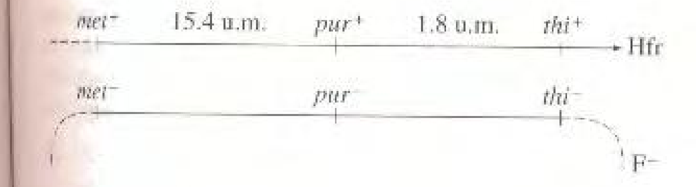
c. ¿Cuáles son las distancias de mapa en unidades de [re]combinación?

♦ Solución ♦

a. La metionina no se añadió en el medio para permitir la se[-]lección de recombinantes met^+, puesto que met^+ es el últ[imo] marcador que entra en la célula recipiente. La selección de $m[et^+]$ nos asegura que todos los loci que estamos considerando en [este] cruzamiento ya habrán entrado en todos los recombinantes a[na]lizados.

b. En este ejemplo ayuda mucho dibujar un esquema del po[si]ble orden de los genes. Puesto que sabemos que *met* entr[a] último en la célula recipiente, sólo existen dos posibilid[ades] para el orden de los genes si el primer marcador entra po[r la] derecha: *met, thi, pur* o *met, pur, thi*. ¿Cómo podemos distin[guir] entre estas dos posibilidades? Afortunadamente, una de las [cua]tro clases posibles de recombinantes requiere dos recombina[cio]nes adicionales. Cada orden posible predice una clase dis[tinta] que surge por cuatro recombinaciones en vez de por dos. [Por] ejemplo, si el orden fuera *met, thi, pur*, entonces los recombin[an]tes met^+ thi^- pur^+ serían muy poco frecuentes. Por otro lad[o, si] el orden fuera *met, pur, thi*, entonces la clase de cuatro recom[bi]naciones sería met^+ pur^- thi^+. A partir de la información [de la] tabla anterior, queda claro que la clase met^+ pur^- thi^+ es la [que] ha sufrido los cuatro acontecimientos de recombinación y, [por] tanto, el orden *met, pur, thi* es el correcto.

c. Observe el siguiente diagrama:



Para estimar la distancia entre *met* y *pur*, calculamos el porcentaje de met^- pur^- thi^-, que es 52/388 = 15.4 u.m. La distancia entre *pur* y *thi* es, de modo similar, 6/388 =1.8 u.m.

4. Compare el mecanismo de transferencia y herencia de los genes lac^+ en cruzamientos con estirpes donantes que sean Hfr, F^+ y F'-lac^-. ¿Cómo se comportaría una célula F^- incapaz de recombinar normalmente (rec^-) en cruzamientos con cada una de estas tres estirpes? ¿Podría la célula heredar los genes lac^+?

♦Solución ♦

Cada una de estas tres estirpes transfiere genes por conjugación. En el caso de las estirpes Hfr y F^+, se transfieren los genes lac^+ del cromosoma hospedador. En la estirpe Hfr, el factor F está integrado en el cromosoma de todas las células, de modo que pueden transferirse marcadores eficazmente, en particular si el marcador está cerca del sitio de integración de F y se transfiere pronto. La población de células F^+ contiene sólo un porcentaje pequeño de células en las que F está integrado en el cromosoma. Estas células son las responsables de la transferencia genética que muestran los cultivos de células F^+. En el caso de la transferencia mediada por las estirpes Hfr y F^+, la herencia requiere la incorporación del fragmento transferido en el cromosoma de la célula F^- (recuerde que se necesitan dos entrecruzamientos). Por consiguiente, una estirpe F^- que sea incapaz de recombinar no puede incorporar el fragmento donante en el cromosoma por recombinación y, por tanto, no puede heredar marcadores cromosómicos de las células donantes, aunque éstas sean estirpes Hfr o células Hfr derivadas de estirpes F^+. Puesto que estos fragmentos no tienen capacidad para replicarse en la célula F^- se pierden rápidamente, por dilución, durante la división celular.

A diferencia de las células Hfr, la transferencia de genes mediada por el factor F' no necesita que ocurra transferencia cromosómica. En el caso de las células F'-*lac*, los genes lac^+ están ligados al plásmido y se transfieren con él con mucha eficacia. No es necesario que ocurra recombinación en la célula F^-, ya que el factor F'-lac^+ puede replicarse y mantenerse en la población de células F^- en división. Por consiguiente, los genes lac^+ se heredan incluso en una estirpe rec^-.

PROBLEMAS

1. Describa el estado en que se encuentra el factor F en cada una de las estirpes Hfr, F^+ y F^-.

2. ¿Cómo transfiere marcadores cromosómicos a las células recipientes un cultivo de células F^+?

3. Establezca analogías en el modo de transferencia génica e integración del gen transferido en el genoma receptor entre los siguientes casos:

   a. Cruzamientos por conjugación con Hfr y transducción generalizada.

   b. Factores F', como el F'-*lac*, y transducción especializada.

4. ¿Por qué puede transferirse cualquier gen por transducción generalizada, mientras que la transducción especializada está restringida a unos pocos?

5. Una genetista microbiana aísla una nueva mutación en *E. coli* y desea localizarla en el cromosoma. Para ello, realiza experimentos de conjugación interrumpida con estirpes Hfr y experimentos de transducción generalizada con el fago P1. Explique por qué cada una de estas técnicas, por separado, es insuficiente para localizar un marcador de forma precisa.

6. Cuatro estirpes Hfr de *E.coli* transfieren los siguientes marcadores en el orden que se indica:

Estirpe 1:	M	Z	X	W	C
Estirpe 2:	L	A	N	C	W
Estirpe 3:	A	L	B	R	U
Estirpe 4:	Z	M	U	R	B

Las cuatro estirpes derivan de la misma estirpe F^+. ¿Cuál es el orden de estos marcadores en el cromosoma circular de la estirpe F^+ original?

7. Contamos con cuatro estirpes de *E. coli* de genotipo a^+ b^- que designamos 1, 2, 3 y 4; y otras cuatro estirpes de genotipo a^- b^+ que designamos 5, 6, 7 y 8. Se mezclan los dos genotipos en todas las combinaciones posibles y, después de la incubación, se siembran en placa para determinar la frecuencia de los recombinantes a^+ b^+. Se obtienen los siguientes resultados, siendo M = muchos recombinantes, L = pocos recombinantes y O = ningún recombinante.

	1	2	3	4
5	0	M	M	0
6	0	M	M	0
7	L	0	0	M
8	0	L	L	0

Teniendo en cuenta estos resultados, asigne un «sexo» (Hfr, F^+ o F^-) a cada estirpe.

8. Se mezcla una estirpe Hfr de genotipo a^+ b^+ c^+ d^- str^s con una estirpe recipiente de genotipo a^- b^- c^- d^+ str^r. A diferentes tiempos, se agita violentamente el cultivo para interrumpir la conjugación. A continuación, se siembran las células en placas de los siguientes tipos, donde el nutriente A permite el crecimiento de las células a^-; el nutriente B, el de las células b^-; el nutriente C, el de las células c^-; y el nu-

triente D, el de las células d^- (el signo + indica presencia de estreptomicina o del nutriente correspondiente, y el signo - su ausencia):

Tipo de medio	Str	A	B	C	D
1	+	+	+	−	+
2	+	−	+	+	+
3	+	+	−	+	+

a. ¿Qué genes del donante se están seleccionando en cada tipo de medio?

b. La tabla siguiente muestra el número de colonias que crecen en cada tipo de medio para muestras tomadas a diferentes tiempos después de mezclar las estirpes. Utilice esta información para determinar el orden de los genes *a*, *b* y *c*.

Tiempo de muestreo minutos	Número de colonias en medio tipo 1	2	3
0	0	0	0
5	0	0	0
7.5	100	0	0
10	200	0	0
12.5	300	0	75
15	400	0	150
17.5	400	50	225
20	400	100	250
25	400	100	250

c. A partir de cada una de las placas sembradas a los 25 minutos, se pican 100 colonias que se transfieren a una placa de medio con todos los nutrientes excepto el D. El número de colonias que crece en este medio es 89 para la muestra procedente del medio de tipo 1, 51 del medio de tipo 2 y 8 para la muestra procedente del medio de tipo 3. Utilizando estos datos, sitúe el gen *d* en la secuencia de genes *a*, *b* y *c*.

d. ¿En qué tiempo de muestreo esperaría que aparecieran colonias por primera vez en medio con C y estreptomicina, pero sin A o B?

(El problema 8 está tomado de D. Freifelder, *Molecular Biology and Biochemistry*. Copyright © 1978 de W. H. Freeman and Company).

9. Nos dan dos estirpes de *E. coli*. La estirpe Hfr es arg^+ ala^+ glu^+ pro^+ leu^+ T^s; la estirpe F^- es arg^- ala^- glu^- pro^- leu^- T^r. Todos son marcadores de auxotrofía excepto *T*, que determina la sensibilidad o la resistencia al fago T1. El orden de entrada es el que se ha dado, siendo arg^+ el primero en entrar en el recipiente y T^r el último. Descubre que la estirpe F^- muere cuando se expone a penicilina (pen^s) pero la estirpe Hfr no (pen^r). ¿Cómo localizaría el locus *pen* en el cromosoma bacteriano con respecto a *arg*, *ala*, *glu*, *pro* y *leu*? Formule su respuesta mediante pasos lógicos y bien explicados, y dibuje un esquema explícito cuando sea posible.

10. Se realiza un cruzamiento entre una estirpe Hfr arg^+ bio^+ leu^+ y una estirpe F^- arg^- bio^- leu^-. Experimentos de conjugación interrumpida demuestran que arg^+ entra en el receptor en último lugar, de modo que se seleccionan recombinantes arg^+ en un medio que contiene sólo *bio* y *leu*. Se determina la presencia de bio^+ y leu^+ en estos recombinantes y se encuentran los siguientes números de cada genotipo:

arg^+ bio^+ leu^+	320
arg^+ bio^+ leu^-	8
arg^+ bio^- leu^+	0
arg^+ bio^- leu^-	48

a. ¿Cuál es el orden de los genes?

b. ¿Cuáles son las distancias de mapa en unidades de recombinación?

11. En una estirpe bacteriana Hfr los mapas de ligamiento se expresan en minutos (el número de minutos entre dos genes indica el período de tiempo que tarda en entrar el segundo gen, respecto al primero, durante la conjugación). Al realizar estos mapas, los genetistas microbianos suponen que el cromosoma bacteriano se transfiere de la estirpe Hfr a la F^- a una velocidad constante. Por tanto, se supone que dos genes separados por 10 minutos cerca del extremo de origen están a la misma distancia física que dos genes separados por 10 minutos cerca del extremo de inserción de F. Sugiera un experimento que permita comprobar la validez de esta suposición.

12. En el cruzamiento Hfr aro^- arg^+ ery^r str^s × F^- aro^- arg^- ery^s str^r, los marcadores se transfieren en el orden indicado (entrando aro^+ el primero), aunque los tres primeros genes se encuentran muy próximos. Los exconjugantes se siembran en un medio que contiene Str (estreptomicina, para seleccionar en contra de las células Hfr), Ery (eritromicina), Arg (arginina), y Aro (aminoácidos aromáticos). Se obtienen los siguientes resultados entre 300 colonias aisladas de las placas y en las cuales se comprobó el crecimiento en distintos medios: sólo con Ery, crecen 263 estirpes; con Ery + Arg, crecen 264 estirpes; con Ery + Aro, crecen 290 estirpes; con Ery + Arg + Aro, crecen 300 estirpes.

a. Escriba una lista de genotipos, indicando el número de individuos de cada genotipo.

b. Calcule las frecuencias de recombinación.

c. Calcule la proporción del tamaño de la región *arg-aro* con respecto al tamaño de la región *ery-arg* completa.

13. Una estirpe concreta Hfr transmite normalmente el marcador pro^+ en último lugar durante la conjugación. En un cruce de esta estirpe con una F^-, aparecen algunos recombinantes pro^+ en las primeras fases del apareamiento. Cuando estas células pro^+ se mezclan con las F^-, la mayoría de las células F^- se convierten en pro^+, que son portadoras también del factor F. Explique estos resultados.

14. En *E. coli*, las estirpes F′ derivan de las Hfr. En algunos casos, estas estirpes F′ muestran un elevado porcentaje de reintegración en el cromosoma de una segunda bacteria. Además, el sitio de integración es a menudo el mismo que el ocupado por el factor sexual en la estirpe Hfr original (antes de la producción de las estirpes F′). Explique estos resultados.

15. Tenemos dos estirpes de *E. coli*, una F^- de genotipo str^r ala^- y una Hfr de genotipo str^s ala^+, en la que el factor F se encuentra integrado próximo a ala^+. Diseñe una prueba que permita detectar las estirpes portadoras de F' ala^+.

16. Cinco estirpes Hfr (A-E) derivan de una misma estirpe F^+ de *E. coli*. A continuación, se presentan los tiempos de entrada a una estirpe F^- de los cinco primeros marcadores cuando se utilizan cada una de dichas estirpes Hfr en un experimento de conjugación interrumpida:

A	B	C	D	E
xyl^+	(1) ade^+	(13) pro^+	(3) pro^+	(10) his^- (7)
r^-	(11) his^+	(28) met^+	(29) gal^-	(16) gal^+ (17)
er^-	(16) gal^-	(38) xyl^+	(32) his^+	(26) pro^+ (23)
de^+	(36) pro^+	(44) mal^+	(37) ade^+	(41) met^+ (49)
u^-	(51) met^+	(70) str^s	(47) ser^-	(61) xyl^+ (52)

a. Dibuje un mapa de la estirpe F^+, indicando las posiciones de todos los genes y las distancias que los separan en minutos.

b. Indique el sitio de integración y la orientación del plásmido F en cada una de las estirpes Hfr.

c. Utilizando cada una de las estirpes Hfr, indique qué gen seleccionaría para obtener la máxima proporción de exconjugantes Hfr.

17. Se transforman células de *Streptococcus pneumoniae* de genotipo str^s mtl^- con DNA donante de genotipo str^r mtl^+ y, en otro experimento, con una mezcla de dos DNA de genotipos str^r mtl^- y str^s mtl^-. La siguiente tabla muestra los resultados.

DNA transformante	Porcentaje de células transformadas a		
	str^s mtl⁻	str^s mtl⁺	str^r mtl⁺
str^r mtl^+	4.3	0.40	0.17
str^r mtl^- + str^s mtl^+	2.8	0.85	0.0066

a. ¿Qué información aporta la primera fila de la tabla? ¿Por qué?

b. ¿Qué información aporta la segunda fila de la tabla? ¿Por qué?

18. Se realiza un experimento de transformación con una estirpe donante resistente a cuatro drogas: A, B, C y D. La estirpe receptora es sensible a las cuatro drogas. La población de células receptoras se divide y se siembra en placas de medios que contienen varias combinaciones de las drogas. La siguiente tabla muestra los resultados.

Droga(s) añadida(s)	Número de colonias	Droga(s) añadida(s)	Número de colonias
Ninguna	10 000	BC	51
A	1156	BC	49
B	1148	CD	786
C	1161	ABC	30
D	1139	ABD	42
AB	46	ACD	630
AC	640	BCD	36
AD	942	ABCD	30

a. Uno de los genes está evidentemente bastante alejado de los otros tres, que parecen estar estrechamente ligados ¿Cuál es el gen distante?

b. ¿Cuál es el orden más probable de los tres marcadores estrechamente ligados?

(El problema 18 está tomado de Franklin Stahl, *The Mechanics of Inheritance*, 2ª ed. Copyright © 1969, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. Reimpreso con autorización.)

19. Recuerde el Capítulo 5, en el que consideramos la posibilidad de que un hecho de recombinación afecte a la probabilidad de que ocurra otro. En el bacteriófago T4, el gen *a* está situado a 1.0 u.m. del gen *b*, el cual a su vez está situado a 0.2 u.m. del gen *c*. El orden de los genes es *a*, *b*, *c*. En un experimento de recombinación obtiene, entre 100 000 virus descendientes, cinco hechos de doble recombinación entre *a* y *c*. ¿Sería correcto concluir que existe interferencia negativa? Explique su respuesta.

20. Ha infectado células de *E. coli* con dos estirpes del virus T4. Una de las estirpes es diminuta (*m*), de lisis rápida (*r*) y turbia (*tu*); la otra es silvestre para los tres marcadores. Se siembran y clasifican los productos de la lisis. De 10 342 halos, se encontraron los siguientes números de cada genotipo:

m r tu	3467	*m* + +	520
+ + +	3729	+ *r tu*	474
m r +	853	+ *r* +	172
m + *tu*	162	+ + *tu*	965

a. Determine las distancias de ligamiento entre *m* y *r*, entre *r* y *tu*, y entre *m* y *tu*.

b. ¿Qué orden sugiere para los tres genes?

c. ¿Cuál es el coeficiente de coincidencia en este cruzamiento y qué significa (véase el Cap. 6)?

(El problema 20 ha sido reimpreso, con autorización de Macmillan Publishing Co., Inc., de Monroe W. Strickberger, *Genetics*, Copyright © 1968 por Monroe Strickberger).

21. Se emplea como fago transductor generalizado el fago P22 incubado sobre una bacteria donante de genotipo pur^+ pro^+ his^+. Se infecta con el virus una estirpe receptora de genotipo pur^- pro^- his^- y se incuba. Seguidamente, se seleccionan entre los transductantes los marcadores pur^+, pro^+ e his^+, de modo individual, en los experimentos I, II y III, respectivamente.

a. ¿Qué medios se utilizan en estos experimentos de selección?

b. Se examina entre los transductantes la presencia de marcadores no seleccionados del donante, obteniendo los resultados siguientes:

I		II		III	
pro^- his^-	87 %	pur^- his^-	43 %	pur^- pro^-	21 %
pro^+ his^-	0 %	pur^+ his^-	0 %	pur^+ pro^-	15 %
pro^- his^+	10 %	pur^- his^+	55 %	pur^- pro^+	60 %
pro^+ his^+	3 %	pur^+ his^+	2 %	pur^+ pro^+	4 %

¿Cuál es el orden de los genes?

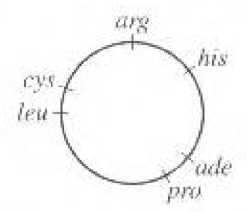
c. ¿Qué dos genes se encuentran más próximos?

d. Basándose en el orden que ha propuesto en la parte c), justifique las proporciones relativas de los genotipos observados en el experimento II.

(El problema 21 está tomado de D. Freifelder, *Molecular Biology and Biochemistry*. Copyright © 1978, W. H. Freeman and Company, Nueva York.)

22. Aunque la mayoría de los transductantes *gal*⁺ mediados por λ son lisógenos inducibles, un porcentaje pequeño de esos transductantes no son lisógenos realmente (no contienen una copia de λ integrada). Experimentos de control indican que estos últimos transductantes no se han originado por mutación. ¿Cuál es su origen más probable?

23. Se sabe que una estirpe bacteriana ade^+ arg^+ cys^+ his^+ leu^+ pro^+ es lisogénica para un fago recién descubierto, pero se desconoce el sitio de integración del profago. El mapa bacteriano es



Se utiliza la estirpe lisogénica para obtener una preparación de fagos, y se añaden dichos fagos a una estirpe bacteriana de genotipo ade^- arg^- cys^- his^- leu^- pro^-. Después de una corta incubación, se siembran muestras de estas bacterias en seis medios diferentes, enriquecidos tal como se indica en la tabla siguiente. La tabla también indica la presencia o ausencia de colonias en los diferentes medios.

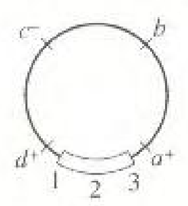
	Enriquecimiento nutritivo en el medio						
Medio	Ade	Arg	Cys	His	Leu	Pro	Presencia de colonias
1	−	+	+	+	+	+	N
2	+	−	+	+	+	+	N
3	+	+	−	+	+	+	C
4	+	+	+	−	+	+	N
5	+	+	+	+	−	+	C
6	+	+	+	+	+	−	N

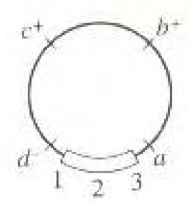
(En la tabla, un signo + indica presencia de un suplemento nutritivo; un signo − indica su ausencia; N indica ausencia de colonias y C indica presencia.)

a. ¿Qué proceso genético está implicado aquí?

b. ¿Cuál es el sitio aproximado de integración del profago?

24. Tenemos dos estirpes de λ que pueden lisogenizar a *E. coli*; la siguiente figura muestra sus mapas de ligamiento:





El fragmento indicado en la parte inferior del cromoso[...] como 1-2-3 es la región responsable del apareamiento [...] recombinación con el cromosoma de *E. coli* (Mantenga [...] marcadores en todos los esquemas.)

a. Haga un diagrama que indique cómo se inserta la es[...]tirpe X de λ en el cromosoma de *E. coli* (de modo que [...] *coli* sea lisogenizada).

b. La bacteria que es lisogénica para la estirpe X se pa[...] de volver a infectar con la estirpe Y. Un porcentaje de[...]minado de estas bacterias se convierten en «lisogénica[s] dobles» (es decir, lisogénicas para ambas estirpes). Ha[ga] un diagrama que explique cómo ocurre esto. (No se pre[o]cupe del modo de detección de estos dobles lisógenos.)

c. Haga un diagrama que represente el emparejamien[to] de los dos profagos λ.

d. Se pueden obtener productos recombinantes entre [los] dos profagos. Haga un diagrama de un entrecruzamien[to] entre ambos y de sus consecuencias.

25. Tenemos tres estirpes de *E. coli*. La estirpe A es F′ cys⁺ *trp1*/*cys*⁺ *trp1* (es decir, tanto el factor F′ como el cromo[-]soma portan *cys*⁺ y *trp1*, alelo responsable del reque[ri]miento de triptófano. La estirpe B es F⁻ *cys*⁻ *trp2* Z (re[-]quiere cisteína para su crecimiento y porta *trp2*, otro al[elo] que provoca requerimiento de triptófano para poder c[re]cer); la estirpe B es lisogénica para el fago Z de transd[uc]ción generalizada. La estirpe C es F⁻ *cys*⁺ *trp1* (es un de[ri]vado F⁻ de la estirpe A, que ha perdido F′). ¿Có[mo] averiguaría si *trp1* y *trp2* son alelos de un mismo loc[us]? (Describa los cruzamientos y los resultados esperados.)

26. Se utiliza un fago transductor generalizado para transd[ucir] una estirpe recipiente de *E. coli* de genotipo a^- b^- c^- d^- [e^-] con una estirpe donante a^+ b^+ c^+ d^+ e^+. El cultivo recep[tor] se siembra en placas de varios medios diferentes, con [los] resultados que se muestran en la tabla siguiente. (Tenga [en] cuenta que el alelo a^- determina requerimiento para el n[u]triente A, y así sucesivamente) ¿Qué puede concluirse so[bre] el ligamiento y el orden de los genes?

Compuestos añadidos al medio mínimo	Presencia (+) o ausencia (-) de colonias
C D E	−
B D E	−
B C E	+
B C D	+
A D E	−
A C E	−
A C D	−
A B E	−
A B D	+
A B C	−

27. En un sistema de transducción generalizada con el fa[go] P1, la estirpe donante es pur^- nad^- pdx^- y la recipien[te] pur^- nad^- pdx^+. Después de la transducción, se selecc[...]

na el alelo pur^+ y se determina la presencia de los otros alelos en 50 transductantes pur^-. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Genotipo	Número de colonias
nad^+ pdx^+	3
nad^+ pdx^-	40
nad^- pdx^+	24
nad^- pdx^-	13
	50

a. ¿Cuál es la frecuencia de cotransducción entre *pur* y *nad*?

b. ¿Cuál es la frecuencia de cotransducción entre *pur* y *pdx*?

c. ¿Cuál de los loci no seleccionados está más cerca de *pur*?

d. ¿Están *nad* y *pdx* al mismo lado de *pur*, o en lados opuestos de *pur*? Explíquelo. (Haga un esquema de los entrecruzamientos necesarios para generar las diferentes clases de transformantes en cada uno de los dos órdenes posibles; y averigüe cuál requiere el menor número de entrecruzamientos para producir los resultados obtenidos.)

28. En un experimento de transducción generalizada, se recogen fagos de una estirpe donante de *E. coli* de genotipo cys^+ leu^+ thr^+ y se utilizan para transducir una recipiente de genotipo cys^- leu^- thr^-. La población de células receptoras se siembra en cajas de medio mínimo con leucina y treonina. Se obtienen muchas colonias.

a. ¿Cuáles son los genotipos posibles de estas colonias?

b. Se replican esas colonias en tres medios diferentes: 1) medio mínimo con treonina, 2) medio mínimo con leucina y 3) medio mínimo. ¿Qué genotipos podrían crecer, en teoría, en estos tres medios?

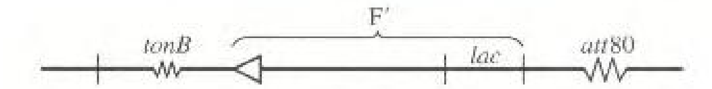
c. Se observa que el 56 % de las colonias originales crece en (1), el 5 % crece en (2), y en (3) no crece ninguna colonia. ¿Cuáles son los genotipos reales de las colonias que crecen en (1), (2) y (3)?

d. Haga un mapa que indique el orden de los tres genes y cuál de los dos genes extremos está más próximo al gen central.

***29.** En 1965, Jon Beckwith y Ethan Signer descubrieron un método para obtener fagos de transducción especializada que portaban la región *lac*. Mediante una aproximación en dos etapas, los investigadores «transpusieron» en primer lugar los genes *lac* a una nueva región del cromosoma y después aislaron las partículas transductoras especializadas. Observaron que el sitio de integración del fago $\phi 80$ (un fago emparentado con el fago λ), designado *att80*, estaba situado cerca de uno de los genes, denominado *tonB*, que confiere resistencia al fago virulento T1:



Beckwith y Signer emplearon un episoma F′ *lac* que no podía replicarse a alta temperatura en una estirpe con una deleción de los genes *lac*. Obligando a la célula a permanecer lac^+ a alta temperatura, los investigadores seleccionaron estirpes en las cuales el episoma se había integrado en el cromosoma, permitiendo así a F′ *lac* mantenerse a alta temperatura. Al combinar este tipo de selección con la selección simultánea de resistencia a la infección del fago T1, descubrieron que los únicos supervivientes eran las células en las cuales F′ *lac* se había integrado en el locus *tonB*, como ilustra la figura siguiente



La región *lac* estaba situada cerca del sitio de integración del fago $\phi 80$. Describa los pasos que estos investigadores tuvieron que realizar a continuación para aislar las partículas transductoras especializadas del fago $\phi 80$ portadoras de la región *lac*.

8

ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN DEL DNA



Cromosomas **en arlequín.** *(Sheldon Wolff/University of California, San Francisco.)*

Ideas fundamentales

Células bacterianas que expresan un fenotipo determinado pueden ser transformadas en células que expresan un fenotipo diferente; el agente transformante es el DNA.

Ciertos experimentos con fagos T2 marcados han permitido establecer que el material hereditario es el DNA.

James Watson y Francis Crick demostraron que la estructura del DNA es una hélice doble. Cada hélice es una cadena de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiésteres. Las dos cadenas helicoidales se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno específicos entre pares de bases.

La estructura del DNA asegura la fidelidad de la replicación porque la complementariedad entre las bases viene determinada por el establecimiento de puentes de hidrógeno específicos.

La replicación del DNA es semiconservativa, en cuanto que cada molécula doble hija contiene una cadena parental y otra recién sintetizada.

Se han caracterizado muchas de las enzimas que participan en la síntesis del DNA.

El esclarecimiento de la estructura del DNA por James Watson y Francis Crick, en 1953, fue uno de los descubrimientos más excitantes de la historia de la Genética. Abrió el camino a la comprensión en términos moleculares de la herencia y de la forma de actuar de los genes. Antes de que veamos cómo se logró resolver la estructura del DNA, resumamos qué se conocía sobre los genes y sobre el DNA en el momento en que Watson y Crick iniciaron su histórica colaboración:

1. Se sabía que los genes —los «factores» hereditarios descritos por Mendel— estaban asociados a caracteres concretos, pero se desconocía su naturaleza física.
2. La teoría «un gen-una enzima» (descrita con más detalle en el Cap. 9) postulaba que los genes controlan la estructura de las proteínas.
3. Se sabía que los genes estaban situados en los cromosomas.
4. Se descubrió que los cromosomas se componían de DNA y proteína.
5. Las investigaciones de Frederick Griffith y, subsecuentemente, las de Oswald Avery y sus colaboradores apuntaban al DNA como el material genético. Tales investigaciones, que se describen aquí, demostraban que las células bacterianas que expresan un fenotipo determinado pueden ser transformadas en células que expresan un fenotipo distinto, y que el agente transformante es el DNA.

El material genético: DNA

La naturaleza física del gen fascinó a los científicos dura años. Una serie de experimentos que se iniciaron en la década d 1920 acabaría por revelar que el material genético es el DNA

El descubrimiento de la transformación

En 1928, en el curso de sus experimentos con la bacteria *Strep coccus pneumoniae*, Frederick Griffith hizo una misteriosa obse vación. Esa bacteria, causante de la neumonía humana, es norma mente letal para los ratones. Sin embargo, han aparecido distinta estirpes de esta especie bacteriana que difieren en cuanto a s virulencia (capacidad para provocar la enfermedad o la muerte Griffith utilizó en sus experimentos dos estirpes que se distinguía por el aspecto de sus colonias crecidas en cultivos de laborator Las células de una de las estirpes, un tipo virulento normal, está rodeadas por una cápsula de polisacáridos que le da a las coloni una apariencia lisa; de ahí que ésta sea denominada estirpe *S*. La células de la otra estirpe de Griffith, un tipo mutante no virulent que se reproduce en los ratones pero no es letal, carecen de es cápsula de polisacáridos, lo cual hace que las colonias tengan u apariencia rugosa; ésta se denomina estirpe *R*.

Griffith mató algunas células virulentas, hirviéndolas, e yectó las células muertas en ratones. Los ratones sobrevivien

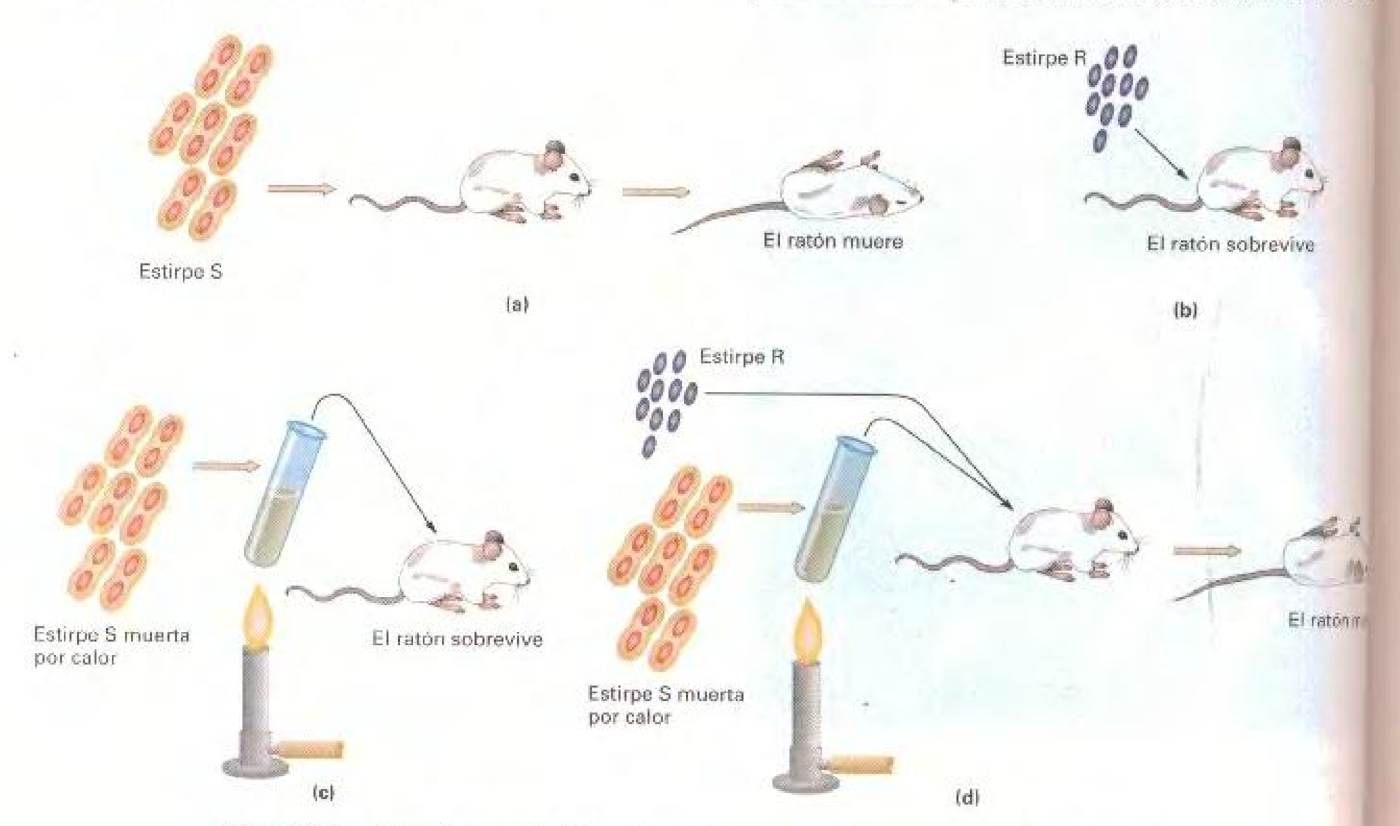


Figura 8-1. Primera demostración de la transformación bacteriana. (a) El ratón muere tras inoculación con la estirpe virulenta S. (b) El ratón sobrevive a la inoculación con la estirpe R. (c) El ratón sobrevive a la inoculación con la estirpe S muerta por calor. (d) El ratón muere tras inoculación con una mezcla de la estirpe R viva y la estirpe S muerta por calor. De alguna manera, la estirpe S muerta transforma a la estirpe R en virulenta. Las partes a, b y c constituyen los controles de este experimento. (Tomado de G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.ª ed. Copyright © 1978 de W. H. Freeman and Company. Según R. Sager y F. J. Ryan, *Cell Heredity*, Wiley, 1961.)

demostrándose así que las cápsulas de las células no provocan la muerte. Sin embargo, ratones inyectados con una mezcla de células virulentas muertas y de células no virulentas vivas, murieron. Además, podían recuperarse bacterias vivas de los ratones muertos; estas células producían colonias lisas y, en subsiguientes inyecciones, eran virulentas. De alguna manera, los restos celulares de las células S hervidas habían convertido a las células R vivas en células S vivas. Este proceso se denomina **transformación**. El experimento de Griffith se resume en la Figura 8-1.

Este mismo método básico fue utilizado para determinar la naturaleza del *principio transformante* —el agente presente en los restos celulares, que es el responsable concreto de la transformación. En 1944, Oswald Avery, C. M. MacLeod y M. McCarty separaron los distintos tipos de moléculas que se encuentran en las células S muertas y estudiaron su capacidad de transformación por separado. Estas pruebas demostraron que los propios polisacáridos no transforman a las células rugosas. Por tanto, la cubierta de polisacáridos, aunque claramente implicada en la acción patogénica, es sólo la expresión fenotípica de la virulencia. Tras el escrutinio de los diferentes compuestos, Avery y sus colaboradores descubrieron que sólo una clase de moléculas, el DNA, inducía la transformación de las células R (Fig. 8-2). Dedujeron que el DNA es el agente que determina la aparición del polisacárido y, por tanto, del carácter patogénico (véase una descripción del mecanismo de transformación en las págs. 219-220). Es más, parecía que proveer a las células R con el DNA de las células S era equivalente a proveerlas de los genes de las células S.

COROLARIO

La demostración de que el principio transformante es el DNA fue la primera demostración de que los genes se componen de DNA.

El experimento de Hershey y Chase

Los experimentos llevados a cabo por Avery y sus colaboradores eran definitivos, pero muchos científicos se resistieron a aceptar como material genético al DNA (y no a las proteínas). La prueba definitiva fue obtenida en 1952 por Alfred Hershey y Martha Chase usando el fago (virus) T2. Su razonamiento fue que la infección del fago debe implicar la introducción (inyección) dentro de la bacteria de la información específica que dicta la reproducción viral. El fago es relativamente simple en cuanto a composición molecular. La mayor parte de su estructura es proteína, estando el DNA en el interior de la envuelta proteica de su «cabeza».

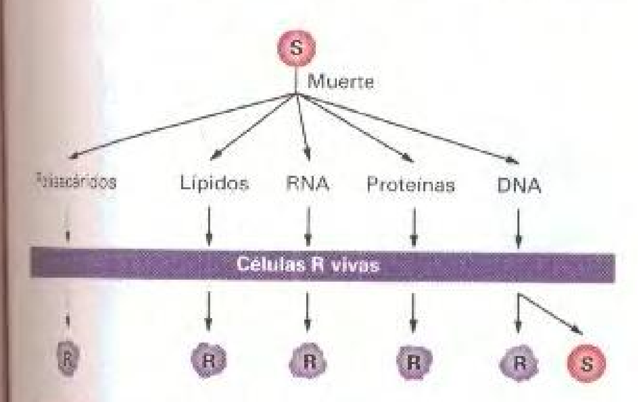


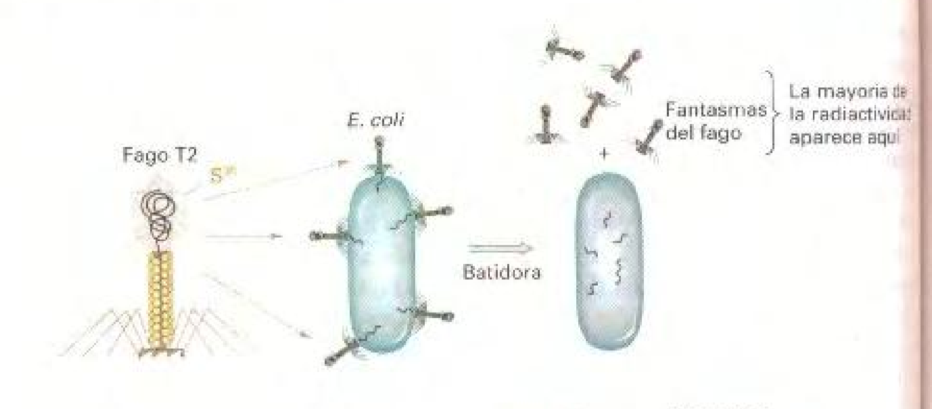
Figura 8-2. Demostración de que el DNA es el agente transformante. El DNA es el único compuesto que provoca la aparición de colonias lisas (S) al añadirlo a células rugosas (R) vivas.

En las proteínas no se encuentra fósforo, que sí forma parte del DNA; inversamente, el azufre está presente en las proteínas pero nunca en el DNA. Hershey y Chase marcaron el DNA del fago con el radioisótopo del fósforo (^{32}P) y las proteínas con el del azufre (^{35}S), en cultivos distintos de fagos. Usaron entonces cada cultivo, por separado, para infectar *E. coli* con muchas partículas de virus por célula. Tras dejar tiempo suficiente para que se produjera la infección, separaron de las células bacterianas las carcasas vacías de los fagos (llamadas *fantasmas*) mediante agitación en una batidora de cocina. Separaron las células bacterianas de los fantasmas de los fagos, mediante centrifugación, y midieron entonces la radioactividad de las dos fracciones. Cuando se utilizaron los fagos marcados con ^{32}P, la mayor parte de la radioactividad terminaba en las células bacterianas, indicando que el DNA viral entraba en las células. También podía recuperarse ^{32}P de los fagos descendientes. Cuando se usaron los fagos marcados con S^{35}, la mayor parte de la radioactividad terminaba en los fantasmas virales, indicando que la proteína viral nunca entra en la célula bacteriana (Fig. 8-3). La conclusión es ineludible: el DNA es el material hereditario; las proteínas del fago son meras empaquetadoras estructurales que se desechan después de inyectar el DNA viral en la célula bacteriana.

¿Por qué tal reticencia en aceptar esta conclusión? Se creía que el DNA era un compuesto químico más bien simplón. ¿Cómo podría una molécula tan simple almacenar toda la información sobre las múltiples características de un organismo? ¿Cómo podía ser transmitida tal información de una generación a la siguiente? Sin duda, el material genético debe poseer tanto la capacidad de poner en clave información específica como la de duplicar tal información de forma precisa. ¿Qué tipo de estructura, en una molécula tan simple, podría explicar unas funciones tan complejas?

La estructura del DNA

Aunque la estructura del DNA era desconocida, sus unidades básicas sí se conocían desde hacía muchos años. Los elementos básicos del DNA se habían aislado y analizado mediante rotura parcial de DNA purificado. Tales estudios demostraban que el DNA estaba compuesto sólo de cuatro moléculas básicas, llamadas **nucleótidos**, idénticas entre sí, excepto por contener cada una una base nitrogenada diferente. Cada nucleótido contiene fosfato, azúcar (del tipo llamado desoxirribosa) y una de las cuatro bases (Fig. 8-4). En ausencia del grupo fosfato, la base y la desoxirribosa forman un **nucleósido** en vez de un nucleótido. Las cuatro bases son **adenina**, **guanina**, **citosina** y **timina**. Los nombres químicos completos de los nucleótidos son 5′-monofosfato de desoxiadenosina (o desoxiadenilato, o dAMP), 5′-monofosfato de desoxiguanosina (o desoxiguanilato, o dGMP), 5′-monofosfato de desoxicitidina (o desoxicitidilato, o dCMP) y



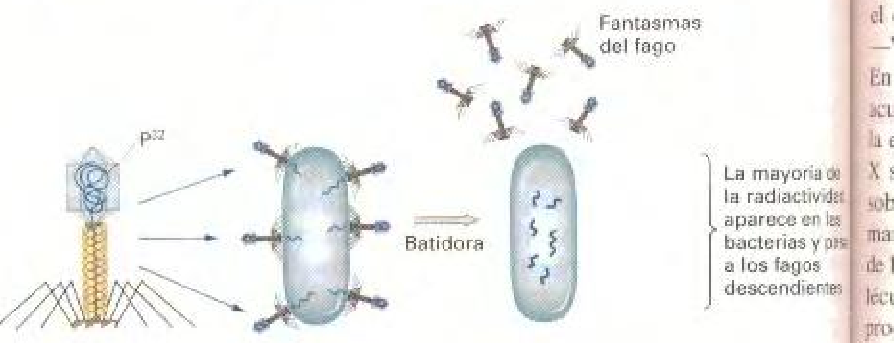
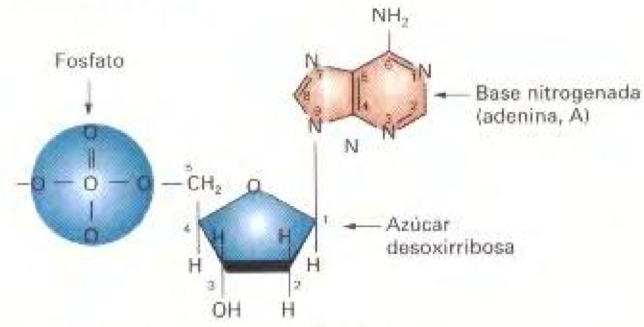


Figura 8-3. El experimento de Hershey y Chase, que demuestra que el material genético del fago es DNA, no proteína. El experimento emplea dos preparaciones de bacteriófagos T2. En una de ellas, las proteínas de la cubierta están marcadas con azufre radioactivo (^{35}S), ausente del DNA. En la otra, el DNA está marcado con fósforo radioactivo (^{32}P), ausente de las proteínas. Sólo el ^{32}P es inyectado dentro de *E. coli*, demostrando que el agente necesario para la producción de nuevos fagos es el DNA.

Nucleótidos púricos

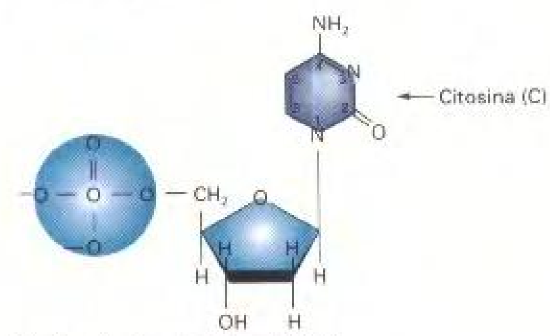


5 -fosfato de desoxiadenosina (dAMP)

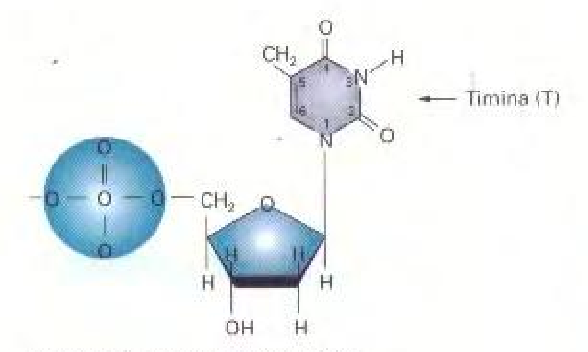
Guanina (G)

5 -fosfato de desoxiguanosina (dGMP)

Nucleótidos pirimidínicos



5 -fosfato de desoxicitidina (dCMP)



5 -fosfato de desoxitimidina (dTMP)

Figura 8-4. Estructura química de los cuatro nucleótidos (dos con bases púricas y dos con bases pirimidínicas) que constituyen los componentes fundamentales del DNA. El azúcar se denomina *desoxirribosa* porque es una variante del azúcar común ribosa, que tiene un átomo más de oxígeno.

5'-monofosfato de timidina (o desoxitimidilato, o dTMP). Sin embargo, resulta más cómodo referirse a cada nucleótido por la abreviatura de su base (A, G, C y T, respectivamente). Dos de las bases, adenina y guanina, son de estructura similar y se denominan **purinas**. Las otras dos bases, citosina y timina, también son similares y se denominan **pirimidinas**.

Después de que se hiciera evidente el papel central del DNA en la herencia, muchos científicos se dispusieron a determinar su estructura con exactitud. ¿Cómo puede una molécula con un rango tan limitado de componentes distintos almacenar la inmensa variedad informativa de las estructuras primarias de todas las proteínas de los seres vivos? Los primeros que tuvieron éxito en el empeño de encontrar una estructura razonable para el DNA —Watson y Crick, en 1953— trabajaron con dos tipos de pistas. En primer lugar, Rosalind Franklin y Maurice Wilkins habían acumulado gran número de datos de difracción de rayos X sobre la estructura del DNA. En estos experimentos, se dirigen rayos X sobre fibras de DNA y se recoge la difracción de los rayos sobre una película fotográfica, en la que los rayos producen manchas. El ángulo de difracción representado por cada mancha de la película suministra información sobre la posición en la molécula de DNA de un átomo, o ciertos grupos de átomos. Este procedimiento no es fácil de llevar a cabo (ni de explicar), y la interpretación de las distribuciones de manchas resulta muy dificultosa. Los datos disponibles sugerían que el DNA es largo y muy fino, y que consta de dos partes similares que corren paralelamente una a otra a lo largo de la molécula. Los datos de rayos X demostraban también que la molécula es helicoidal (como una espiral). Se presentaban otras regularidades en la distribución de manchas, pero nadie había pensado todavía en una estructura tridimensional que diera cuenta exacta de esos patrones de manchas.

El segundo tipo de datos a disposición de Watson y Crick procedía del trabajo realizado varios años antes por Erwing Chargaff. Estudiando una variada gama de DNA de diferentes organismos (Cuadro 8-1), Chargaff estableció ciertas reglas empíricas sobre las cantidades de cada componente del DNA:

1. La cantidad total de nucleótidos pirimidínicos (T + C) es siempre igual a la cantidad total de nucleótidos púricos (A + G).
2. La cantidad de T es siempre igual a la de A, y la cantidad de C es siempre igual a la de G. Pero la cantidad de A + T no es necesariamente igual a la de G + C, como puede verse en la última columna del Cuadro 8-1. Este cociente varía entre distintos organismos.

La hélice doble

La estructura que diseñaron Watson y Crick a partir de esas pistas es una **hélice doble**, parecida a dos muelles entrelazados. Cada muelle (hélice) es una ristra de nucleótidos unidos por **enlaces fosfodiésteres**, en los que un grupo fosfato forma un puente entre grupos —OH de dos residuos de azúcar adyacentes. Los dos «muelles» (hélices) se mantienen juntos mediante **puentes de hidrógeno**, en los que dos átomos electronegativos «comparten» un protón entre las bases. Los puentes de hidrógeno se forman entre átomos de hidrógeno con una pequeña carga positiva y átomos aceptores con una pequeña carga negativa. Por ejemplo,

Cada átomo de hidrógeno de un grupo NH_2 es ligeramente positivo (δ^+) porque el átomo de nitrógeno atrae a los electrones implicados en el enlace N—H, dejando así al átomo de hidróge-

CUADRO 8-1. Proporciones molares de las bases* de DNA de distintos orígenes

Organismo	Tejido	Adenina	Timina	Guanina	Citosina	A + T / G + C
Escherichia coli (K12)	—	26.0	23.9	24.9	25.2	1.00
Diplococcus pneumoniae	—	29.8	31.6	20.5	18.0	1.59
Mycobacterium tuberculosis	—	15.1	14.6	34.9	35.4	0.42
Levadura	—	31.3	32.9	18.7	17.1	1.79
Paracentrotus lividus (erizo de mar)	Esperma	32.8	32.1	17.7	18.4	1.85
Arenque	Esperma	27.8	27.5	22.2	22.6	1.23
Rata	Médula ósea	28.6	28.4	21.4	21.5	1.33
Hombre	Timo	30.9	29.4	19.9	19.8	1.52
Hombre	Hígado	30.3	30.3	19.5	19.9	1.53
Hombre	Esperma	30.7	31.2	19.3	18.8	1.62

*Expresadas en moles de nitrógeno constituyente por cada 100 átomos gramo de fosfato del hidrolizado.

Fuente: E. Chargaff y J. Davidson, eds., *The Nucleic Acids*. Academic Press, 1955.

no ligeramente escaso de electrones. El átomo de oxígeno tiene seis electrones sueltos en su capa externa que lo hacen ligeramente negativo (δ^-). Se forma, pues, un puente de hidrógeno entre un H y un O. Los puentes de hidrógeno son enlaces muy débiles (del orden sólo del 3 % de la fuerza de un enlace químico covalente) pero, como veremos, esta debilidad juega una función importante en el papel de la molécula de DNA en la herencia. Un aspecto químico adicional importante: el puente de hidrógeno es mucho más fuerte si los átomos implicados «apuntan uno al otro» en las orientaciones más idóneas.

Los puentes de hidrógeno se forman entre pares de bases y están indicados por líneas discontinuas en la Figura 8-5, que muestra una parte de la doble estructura emparejada, con las hélices desenrolladas. Cada par de bases consiste en una purina y una pirimidina, emparejadas según la regla siguiente: G empareja con C, y A lo hace con T. En la Figura 8-6, un esquema simple de la doble hélice, cada par de bases se representa por un «palito» entre las «cintas» o «esqueletos azúcar-fosfato» de las cadenas de nucleótidos. Observe en la Figura 8-5 que las dos cade-

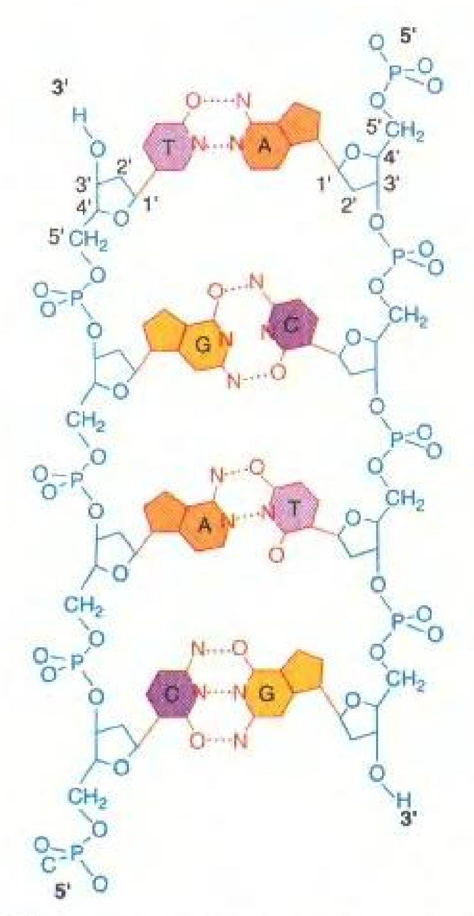


Figura 8-5. Doble hélice de DNA, desenrollada para mostrar los esqueletos azúcar-fosfato (en azul) y los escalones de pares de bases (en rojo). Los esqueletos corren en direcciones opuestas; los extremos se denominan 5' y 3' según la orientación de los átomos de carbono 5' y 3' de los anillos de azúcar. Cada par de bases consta de una purina, adenina (A) o guanina (G), y una pirimidina, timina (T) o citosina (C), conectadas mediante puentes de hidrógeno (*líneas punteadas*). (Tomada de R.E. Dickerson, «The DNA Helix and How it is Read». Copyright © 1983 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

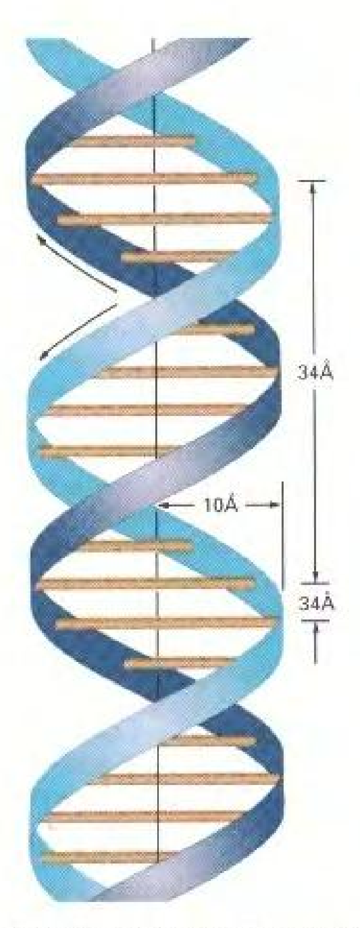


Figura 8-6. Modelo simplificado de la estructura helicoidal del DNA. Los palitos representan pares de bases, y las cintas representan los esqueletos azúcar-fosfato de las dos cadenas antiparalelas. Las distintas medidas se dan en angstroms (1 Å = 0.1 nm).

nas corren en direcciones opuestas; se dice que son **antiparalas**, y (por razones aparentes en la figura) una se denom cadena 5' → 3' y la otra cadena 3' → 5'.

La doble hélice da cuenta perfectamente de los datos de ray X y también se ajusta muy bien a los datos de Chargaff. Es diando las maquetas que hicieron de la estructura, Watson Crick notaron que el diámetro observado de la doble hélice (c nocido por los datos de rayos X) se explicaría si una base puri empareja siempre (mediante puentes de hidrógeno) con otra pi midínica (Fig. 8-7). Tal emparejamiento explicaría la regula dad (A + G) = (T + C) observada por Chargaff, pero predeci cuatro posibilidades: T ··· A, T ··· G, C ··· A y C ··· G. Sin e bargo, los datos de Chargaff indicaban que T empareja sólo c A y C lo hace sólo con G. Watson y Crick demostraron que s esos dos emparejamientos tienen las conformaciones comple mentarias, tipo «llave-cerradura», adecuadas para permitir formación eficiente de los puentes de hidrógeno (Fig. 8-8).

Observe que el par G—C establece tres puentes de hidróg mientras que el par A—T establece sólo dos. Predeciríamos qu DNA que contenga muchos pares G—C será más estable q el DNA que contenga muchos pares A—T. En realidad, tal p dicción ha sido confirmada. La estructura del DNA explica cramente los datos de Chargaff (Fig. 8-9) y es consistente c los datos de rayos X.

Imagen tridimensional de la doble hélice

Vistas en tres dimensiones, las bases aparecen más bien como estructuras planas que se apilan parcialmente unas sobre otras en la estructura retorcida de la hélice doble. Este apilamiento de bases coopera tremendamente a la estabilidad de la molécula al excluir las moléculas de agua de los espacios entre los pares de bases. (Este fenómeno se parece mucho a la fuerza estabilizadora que se percibe al introducir en el agua dos placas de cristal unidas y se intenta, a continuación, separarlas). Posteriormente, se observó que había dos formas de DNA en las fibras analizadas mediante difracción. La **forma A** está menos hidratada que la **forma B**, y es más compacta. Se cree que la forma B del DNA es la que se encuentra comúnmente en las células vivas.

El apilamiento de las bases en la doble hélice genera dos surcos en los esqueletos azúcar-fosfato. Tales surcos se denominan surco **mayor** y surco **menor** y pueden observarse fácilmente en el modelo (tridimensional) de espacios atómicos de la Figura 8-9*a*.

Pirimidina + pirimidina:
DNA demasiado fino

Purina + purina:
DNA demasiado grueso

Purina + pirimidina:
diámetro compatible
con los datos de rayos X

Figura 8-7. El emparejamiento de purinas y pirimidinas se corresponde exactamente con el diámetro de la hélice doble de DNA, calculado con los datos de rayos X. (Tomado de R. E. Dickerson, «The DNA Helix and How It Is Read». Copyright © 1983 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

Implicaciones de la estructura del DNA

La elucidación de la estructura del DNA provocó una gran excitación entre los genetistas, y en todas las áreas de la Biología, por dos razones fundamentales. En primer lugar, la estructura sugería una forma obvia por la que la molécula puede ser **duplicada**, o **replicada**, ya que cada base determina a su complementaria mediante los puentes de hidrógeno. Hasta entonces, esta propiedad esencial de la molécula genética había sido un misterio. En segundo lugar, la estructura hace pensar que quizás la *secuencia* de pares de nucleótidos del DNA dicte la secuencia de aminoácidos de la proteína determinada por un gen. En otras palabras, algún tipo de **código genético** podría escribir información en el DNA como una secuencia de pares de nucleótidos y traducirla luego al lenguaje diferente de secuencias de aminoácidos de las proteínas.

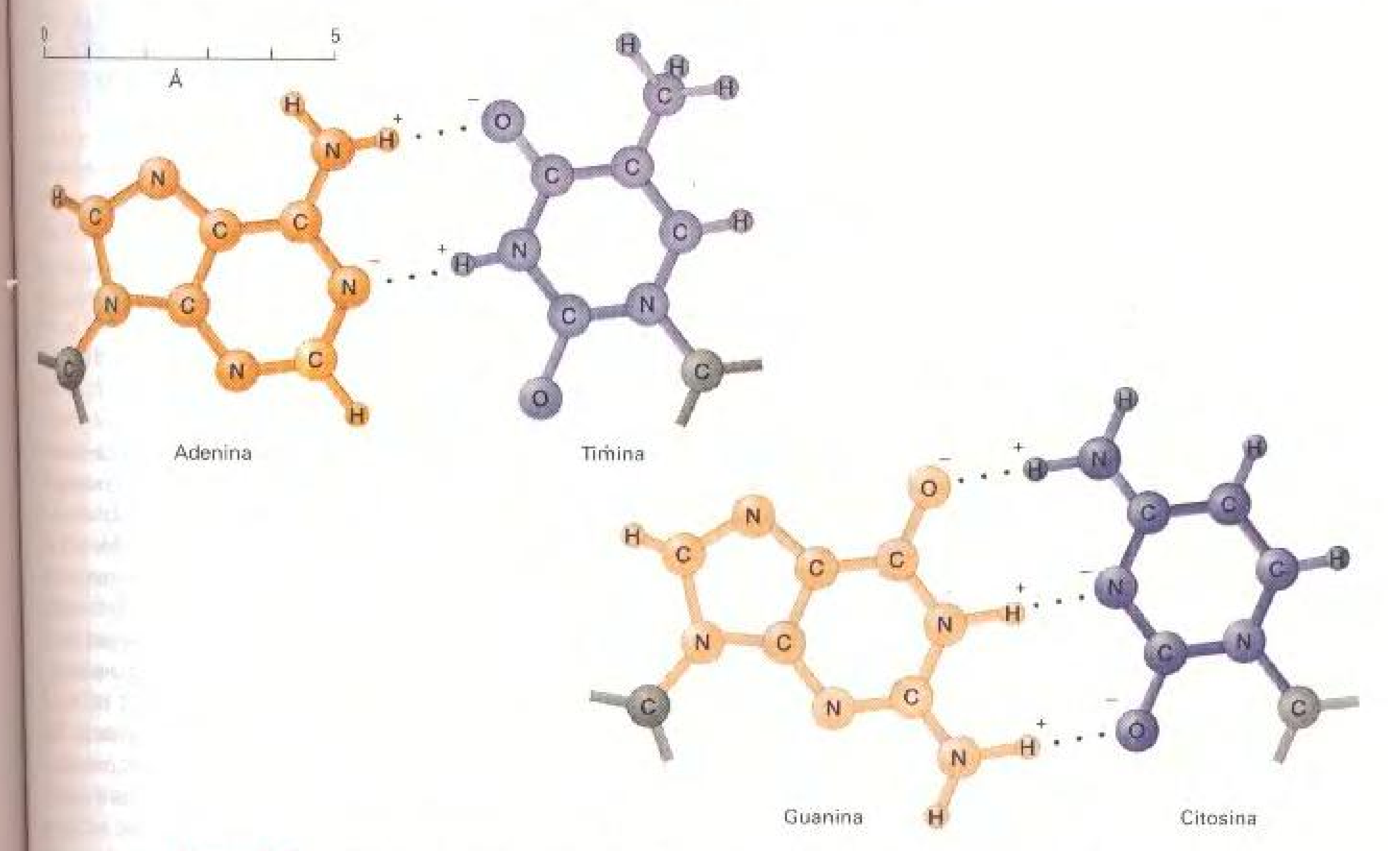


Figura 8-8. Encaje mediado por puentes de hidrógeno, a modo de «llave y cerradura», entre A y T y entre G y C (Tomado de G.S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Copyright © 1963 de W.H. Freeman and Company).

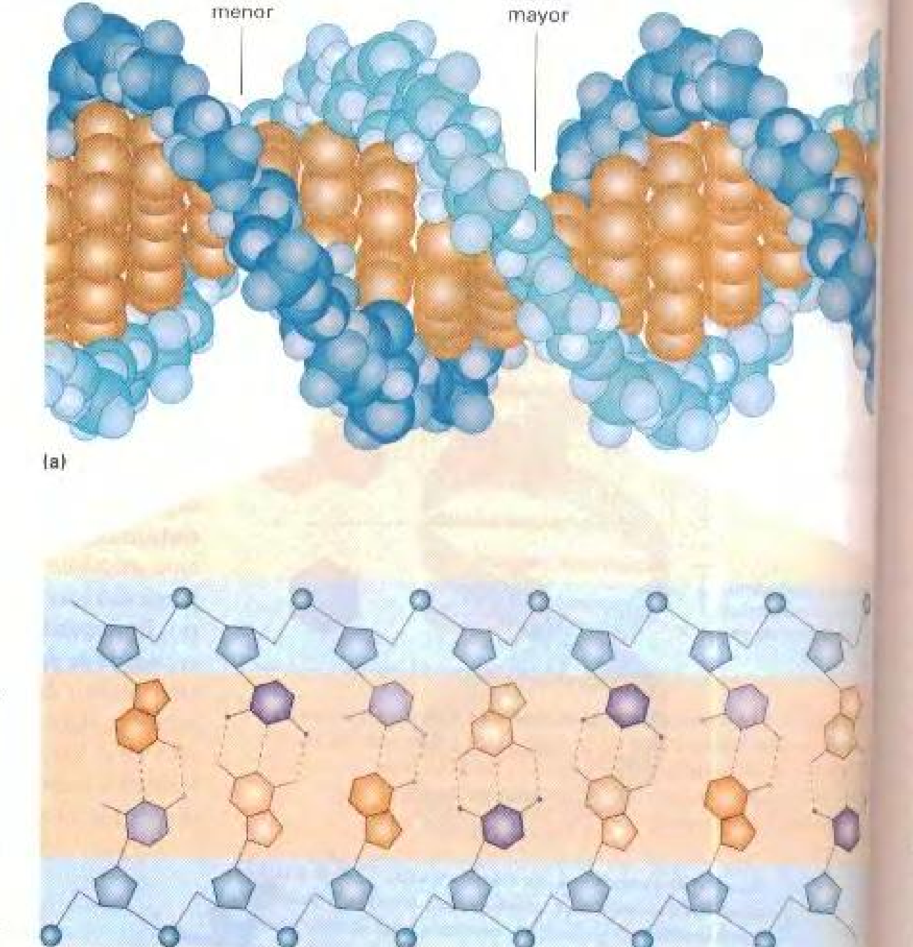


Figura 8-9. (a) Modelo de espacios atómicos de la doble hélice de DNA. (b) Representación de un corto segmento de pares de nucleótidos desenrollado, en el que se aprecia cómo los emparejamientos A—T y G—C generan las proporciones de Chargaff. Este modelo corresponde a una de las diversas formas del DNA, llamada *forma B*. (Parte «a» tomada de C. Yanofsky, «Gene structure and Protein Structure», Copyright © 1967 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos. Parte «b» según en A. Kornberg, «The Synthesis of DNA». Copyright © 1968, de Scientific American Inc. Reservados todos los derechos.)

Estos datos básicos sobre el DNA son ahora familiares a casi cualquiera que haya leído un texto de Biología en la escuela primaria o secundaria, o incluso periódicos y revistas. Pero trate de trasladarse al escenario de 1953 e imagine la excitación de entonces. Hasta ese momento, la evidencia de que el poco interesante DNA era el material genético resultaba descorazonadora y decepcionante. Pero la estructura de Watson y Crick abría de repente la posibilidad de explicar dos de los grandes «secretos» de la vida. James Watson ha contado la historia de este descubrimiento (desde su peculiar punto de vista, fuertemente cuestionado por otros participantes en esa historia) en un libro fascinante, titulado *La Doble Hélice*, que revela el intrincado juego de enfrentamientos entre personalidades, inteligentes apreciaciones, trabajo duro y puro azar, que rodea a avances científicos de esta importancia.

Estructuras alternativas

Además de las formas A y B del DNA, se ha encontrado un nuevo tipo de estructura en cristales de un DNA sintético que contiene residuos nucleotídicos G y C alternados en la misma cadena. Este tipo de DNA, la **forma Z**, dispone su esqueleto en zigzag y genera una hélice «a izquierdas», mientras que las formas A y B del DNA son hélices «a derechas».

Replicación del DNA

La transmisión fiel de la información hereditaria depende de la replicación exacta del material genético. Esta sección exami[na] los mecanismos de replicación del DNA

Replicación semiconservativa

La Figura 8-10 muestra un diagrama del posible mecanismo b[á]sico de replicación propuesto por Watson y Crick. Los esque[le]tos de azúcar-fosfato se representan como líneas y la secuen[cia] de pares de bases es aleatoria. Imaginemos que la doble hélic[e] como una cremallera que se abre a partir de un extremo (el i[nfe]rior de la Fig. 8-10). Vemos que, si la analogía de la cremall[era] es válida, el desenrollamiento de las dos cadenas dejará exp[ues]tas las bases de cada una de ellas. Debido a la estricta restricci[ón] de emparejamientos impuesta por la estructura del DNA, c[ada] base expuesta emparejará sólo con su complementaria. D[e] esta complementariedad de bases, cada una de las cadenas [ac]tuará como **molde**, o plantilla, y empezará a reproducir una h[éli]ce doble idéntica a la que se abrió. Se supone que los nue[vos] nucleótidos incorporados proceden de una reserva de nucle[óti]dos libres que estaría presente en la célula.

Si este modelo es correcto, cada molécula hija debe contener una cadena de nucleótidos parental y otra sintetizada de nuevo. Esta predicción se ha sometido a prueba tanto en procariotas como en eucariotas. Pensando un poco veríamos que la molécula de DNA parental podría estar relacionada con las moléculas hijas de tres formas diferentes. Estas formas diferentes se denominan semiconservativa (el modelo de Watson y Crick), conservativa y dispersiva (Fig. 8-11). En la **replicación semiconservativa**, cada hélice doble hija contiene una cadena parental y otra recién sintetizada. En la **replicación conservativa**, sin embargo, una hélice doble hija está formada por dos cadenas sintetizadas de nuevo, conservándose la hélice doble parental. La **replicación dispersiva** da lugar a dos moléculas hijas cuyas cadenas contienen sólo ciertos *segmentos* de DNA parental y otros sintetizados de nuevo.

El experimento de Meselson y Stahl

En 1958, Matthew Meselson y Franklin Stahl se propusieron distinguir experimentalmente entre esas tres posibilidades. Cultivaron células de *E. coli* en un medio que contenía un isótopo pesado del nitrógeno (^{15}N) en vez del isótopo ligero normal (^{14}N). El isótopo pesado se incorporó a las bases nitrogenadas, que se incorporarían a su vez a las nuevas cadenas de DNA. Tras muchas divisiones celulares en presencia de ^{15}N, el DNA de todas las células debería estar bien marcado con el isótopo pesado. A continuación, separaron las células del medio con ^{15}N y las pusieron en un medio con ^{14}N, tomando muestras después de una y dos divisiones celulares. Extrajeron el DNA de las células de cada una de estas muestras y lo centrifugaron en una solución de cloruro de cesio (CsCl).

Si el cloruro de cesio se centrifuga a gran velocidad (50 000 rpm) durante muchas horas, los iones de cloruro y de cesio son empujados por la fuerza centrífuga hacia el fondo del tubo. Al final, se establece un gradiente de iones Cs^+ y Cl^- en el tubo, con mayores concentraciones de ellos en el fondo. También las moléculas de DNA en solución son empujadas hacia el fondo por la fuerza centrífuga. Pero en su trayecto hacia el fondo encuentran una concentración de sal cada vez mayor que tiende a empujarlas de nuevo hacia arriba, debido a la flotabilidad del DNA (su tendencia a flotar). Así pues, el DNA se «deposita» finalmente en cierta posición del tubo, justo donde la fuerza centrífuga compensa la flotabilidad de las moléculas en el gradiente de cloruro de cesio. La flotabilidad del DNA depende de su densidad (la cual, a su vez, depende de la relación de pares G—C a pares A—T). La presencia del isótopo más pesado del nitrógeno cambia la densidad de flotación del DNA. El DNA extraído de células que han crecido durante muchas generaciones en medio con ^{15}N puede distinguirse con facilidad del DNA de las células que lo han hecho en medio con ^{14}N por la posición de equilibrio que alcanzan en el gradiente de cloruro de cesio. Tales muestras se denominan familiarmente DNA *pesado* y *ligero*, respectivamente.

Meselson y Stahl comprobaron que una generación después de que las células *pesadas* se trasladaron a medio con ^{14}N el DNA formaba una única banda, de densidad intermedia entre las densidades de los controles pesado y ligero. Después de dos generaciones en medio con ^{14}N, el DNA formaba dos bandas: una en la posición intermedia y la otra en la posición ligera (Fig. 8-12). Éste es el resultado esperado del modo de replicación semiconservativa; de hecho, el resultado es compatible *sólo* con este mo-

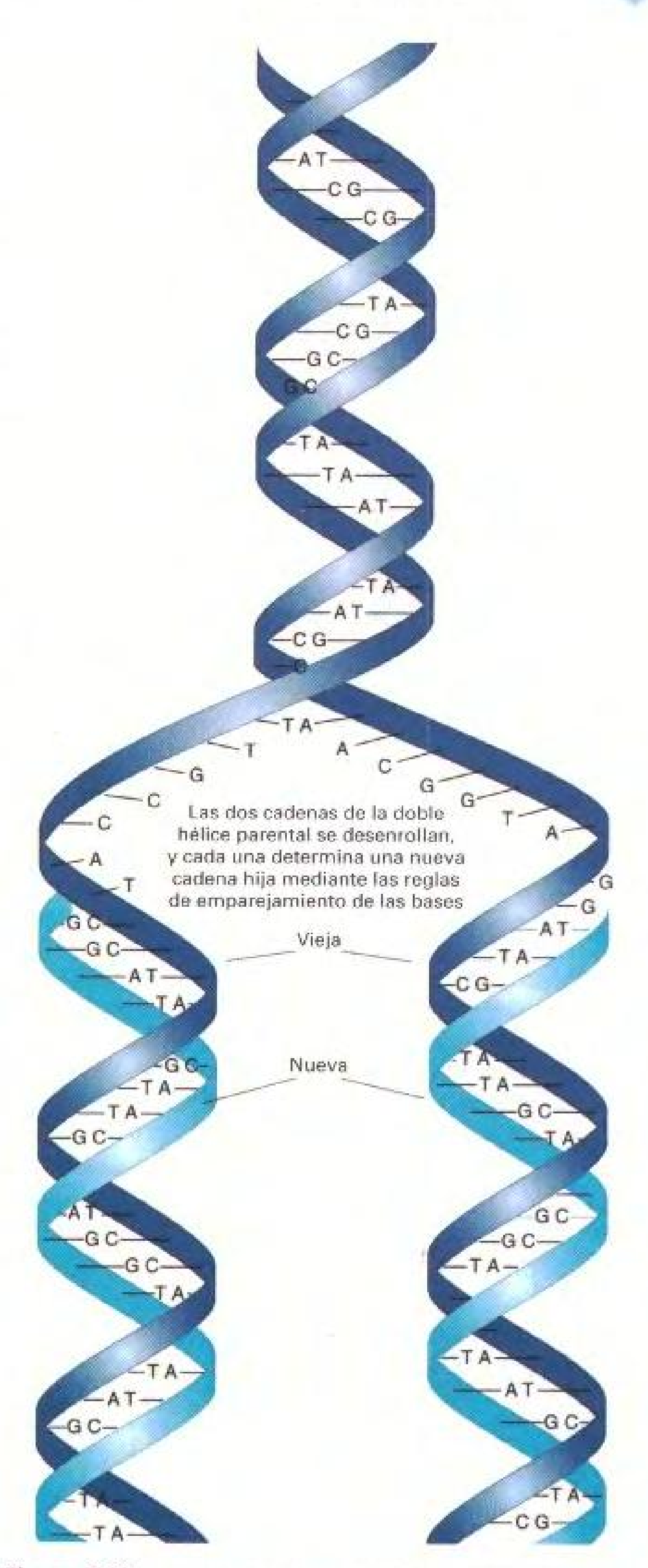


Figura 8-10. El modelo de replicación del DNA propuesto por Watson y Crick está basado en la especificidad de los puentes de hidrógeno entre los pares de bases. Las cadenas complementarias aparecen en distinto color. Este dibujo es una versión simplificada de nuestra idea actual de cómo ocurre la replicación, pero representa bien la idea básica sugerida por la estructura de Watson y Crick. El hecho de que las cadenas nuevas pueden alargarse sólo en dirección 5' a 3' añade mayor complejidad al mecanismo real de la replicación.

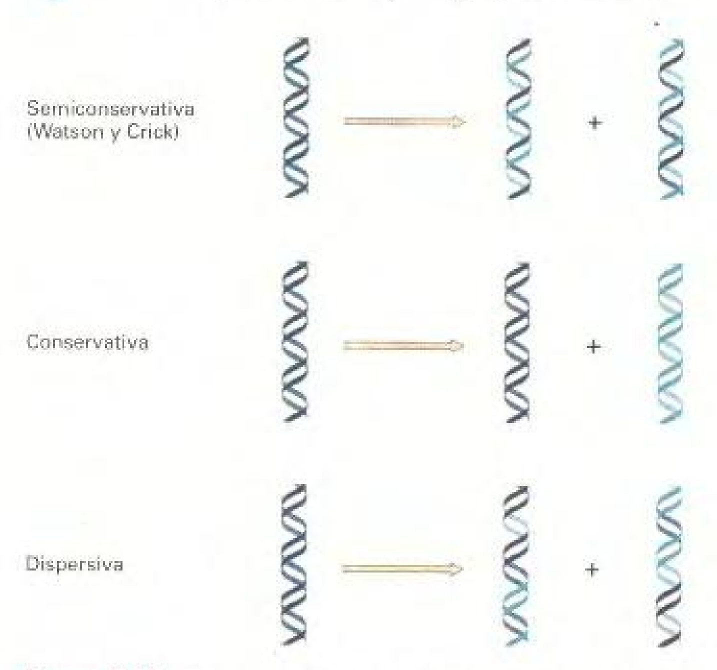


Figura 8-11. Tres formas alternativas de replicación del DNA. El modelo de Watson y Crick corresponde a la primera forma (semiconservativa). Las líneas de color azul claro representan las cadenas sintetizadas de nuevo.

delo, *si* el experimento se inicia con cromosomas constituidos por hélices dobles individuales (Fig. 8-13).

Autorradiografía

El experimento con *E. coli* de Meselson y Stahl fue prácticamente repetido con cromosomas de células de raíces de judía por Herbert Taylor, en 1958, utilizando técnicas citológicas. Taylor puso las células de raíz en una solución que contenía timidina tritiada [timidina-(^{3}H)], el nucleótido timidina marcado con un isótopo radiactivo del hidrógeno llamado *tritio*. Dejó que las células realizaran la mitosis en esta solución, de manera que la timidina-(^{3}H) pudiera incorporarse al DNA. Lavó entonces las puntas de raíz y las trasladó a una solución que contenía timidina no radiactiva. La adición de colchicina a esta preparación inhibe la formación del huso acromático, de manera que los cromosomas metafásicos no se separan y las cromátidas hermanas permanecen unidas entre sí por el centrómero.

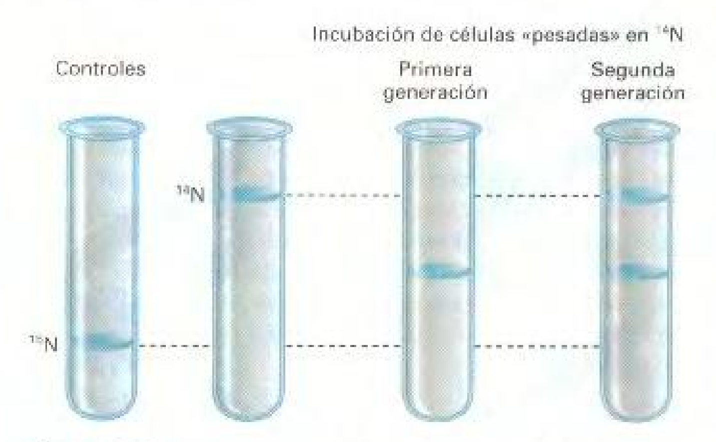


Figura 8-12. Centrifugación de DNA en un gradiente de cloruro de cesio (CsCl). Los cultivos mantenidos durante muchas generaciones en medio con ^{15}N ó ^{14}N permiten establecer los controles de posición de las bandas de DNA pesado y ligero, respectivamente. Cuando células cultivadas en ^{15}N se transfieren a medio con ^{14}N, la primera generación produce una banda de DNA intermedia, y la segunda generación produce dos bandas, una intermedia y otra ligera.

La localización celular del ^{3}H puede hacerse mediante autorradiografía. Al descomponerse, el ^{3}H emite una partícula beta (un electrón con energía). Si se coloca una lámina de emulsión fotográfica sobre una célula que contiene ^{3}H, se produce una reacción química allí donde una partícula beta choca con la emulsión. Ésta puede revelarse entonces como una fotografía, de forma que las emisiones de las partículas beta aparecen como granos o manchas negras. Además, la célula puede teñirse para hacer visibles sus estructuras e identificar la fuente de la radiactividad. La autorradiografía es un método en el que, en efecto, estructuras celulares radiactivas «se fotografían a sí mismas».

La Figura 8-14 muestra los resultados observados cuando se añade la colchicina durante la división en timidina-(^{3}H) o durante la división mitótica siguiente. Estos resultados pueden inter-

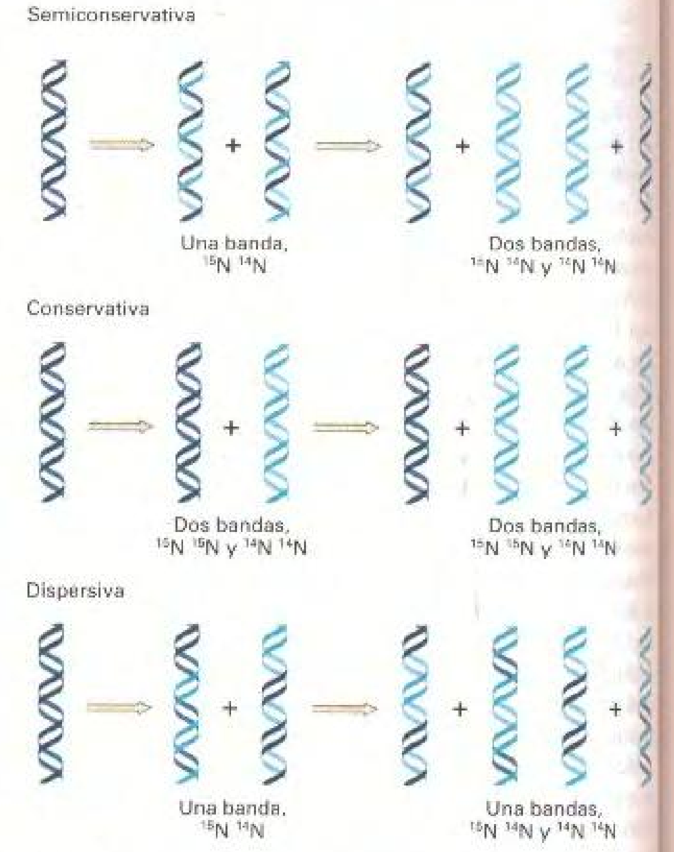


Figura 8-13. Sólo el modelo semiconservativo de replicación del DNA predice resultados como los de la Figura 8-12: una banda intermedia en la primera generación y una intermedia y otra ligera en la segunda generación. (Véase explicación de los colores en la Fig. 8-11.) Recuerde que tras el crecimiento en ^{15}N, las células se pasaron a ^{14}N.

pretarse representando cada cromátida como una molécula única de DNA que se replica de forma semiconservativa (Fig. 8-15).

Cromosomas en arlequín

Usando una técnica de tinción más moderna, es posible visualizar la replicación semiconservativa de los cromosomas en mitosis sin necesidad de autorradiografía. En este método, se deja que los cromosomas sufran dos ciclos de replicación en presencia de bromodesoxiuridina (BUdR). El patrón del marcado con BUdR, que aparece en la Figura 8-16*a*, es el recíproco del de la Figura 8-15, porque se emplea BUdR en las dos replicaciones, en vez de ser sustituida por timina normal durante la segunda replicación, como en el procedimiento de la autorradiografía. Entonces, se tiñen los cromosomas con Giemsa y con un colorante fluorescente; este método distingue entre las cromátidas híbridas, con una cadena que contiene BUdR y otra cadena original (teñidas de oscuro), y las cromátidas cuyas dos cadenas contienen BUdR (de color claro), generando los llamados **cromosomas en arlequín** (Fig. 8-16*b*). (Observe, de paso, que los cromosomas en arlequín son particularmente adecuados para detectar intercambios entre cromátidas hermanas en la mitosis; en la Figura 8-16*b* se ven dos ejemplos). Empleando técnicas similares, Taylor demostró que la replicación cromosómica durante la meiosis es también semiconservativa.

La estructura del cromosoma

Las Figuras 8-14 y 8-15 traen a colación una de las grandes cuestiones genéticas no resueltas todavía: un cromosoma eucariótico ¿es esencialmente una única molécula de DNA envuelta por una matriz de proteína? Dos hechos apoyan contundentemente que, en efecto, así es. En primer lugar, si hubiera muchas moléculas de DNA en el cromosoma (ya sea dispuestas unas al lado de otras, extremos con extremos, u orientadas al azar), sería casi imposible que los cromosomas se replicaran de forma semiconservativa (yendo todo el material marcado a una cromátida, según los resultados de Taylor). Estudios con cromosomas aislados y largas moléculas de DNA apoyan la idea de que cada cromátida es una molécula única de DNA. El segundo hecho que apoya la hipótesis de una única molécula es que el DNA y los genes se comportan como si estuvieran unidos extremo con extremo en una única ristra o cadena, que llamamos un *grupo de ligamiento*. Todos los datos de ligamiento (Cap. 5) nos dicen que no necesitamos más que una única serie lineal de genes por cada cromosoma para explicar los fenómenos genéticos. Como vimos en el Capítulo 3, se ha demostrado de forma convincente que un cromosoma o cromátida contiene en realidad una sola molécula de DNA.

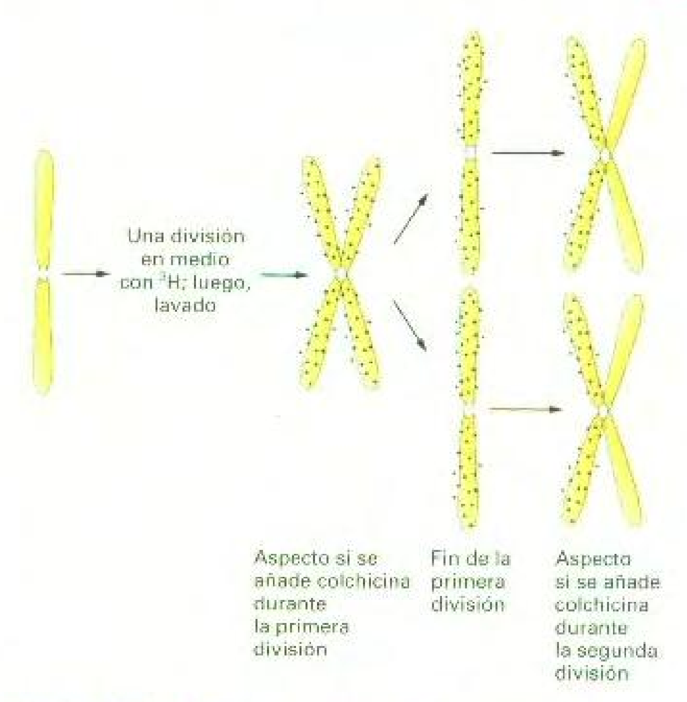


Figura 8-14. Esquema de la autorradiografía de cromosomas de células cultivadas durante un ciclo de división en presencia del isótopo radiactivo del hidrógeno ^3H (tritio) y cultivadas después en un medio no radiactivo durante una segunda división mitótica. Cada punto representa la huella dejada por una partícula de radiactividad.

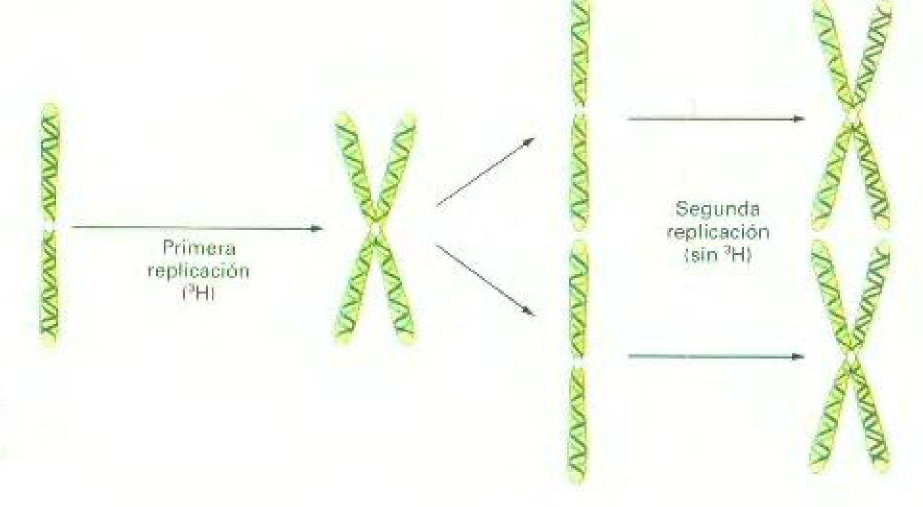


Figura 8-15. Interpretación de la Figura 8-14 a nivel del DNA. Las líneas en azul claro representan cadenas radiactivas. En la segunda replicación (que tiene lugar en una solución no tritiada) tanto la cadena marcada de ^3H como la cadena no tritiada actúan de molde para la incorporación de nucleótidos no radiactivos, generándose una cromátida híbrida y otra no tritiada.

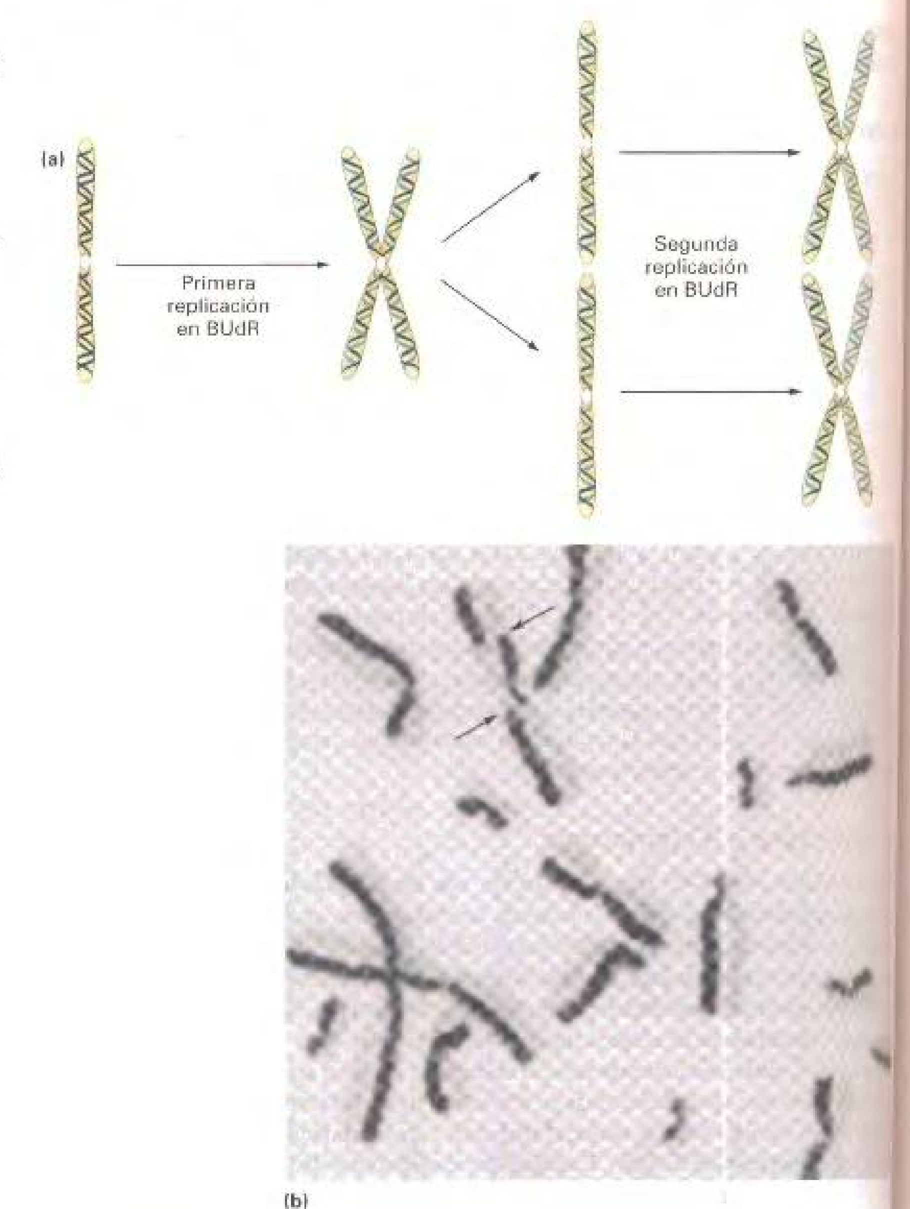


Figura 8-16. (a) Esquema de la generación de cromosomas en arlequín. El método consiste en dejar que los cromosomas pasen dos ciclos de replicación en presencia de bromodesoxiuridina (BUdR), que sustituye a la timidina en el DNA sintetizado de nuevo. Al teñir entonces los cromosomas con un colorante fluorescente y con Giemsa, se produce el aspecto de la figura. (Las líneas de color azul claro representan las cadenas que han incorporado BudR). (b) Fotografía de cromosomas en arlequín de células de ovario de hámster chino (CHO). Las cromátidas con dos cadenas que contienen BUdR aparecen más claras en la fotografía, mientras que aquellas con una cadena original y otra hecha de BUdR aparecen más oscuras. En la parte superior (flechas), aparece un cromosoma que ha sufrido dos intercambios entre cromátidas hermanas. (Fotografía cortesía de Sheldon Wolf y Judy Bodycote.)

La horquilla de replicación

Una predicción del modelo de replicación del DNA de Watson y Crick es que, cuando está siendo replicada, en la molécula de DNA debe encontrarse una **horquilla** de replicación. John Cairns, en 1963, puso a prueba esta predicción dejando que el DNA en replicación de células bacterianas incorporara timidina tritiada. Teóricamente, cada molécula hija sintetizada de nuevo debe contener entonces una cadena radiactiva («caliente») y otra no radiactiva («fría»). Tras variar el período y el número de ciclos de replicación en medio «caliente», Cairns extrajo el DNA de las células, lo puso en un portaobjetos y lo autorradiografió para observarlo luego al microscopio óptico. Tras un ciclo de replicación en timidina-(^{3}H), aparecieron anillos de puntos en la autorradiografía. Cairns interpretó los anillos como se muestra en la Figura 8-17. En ella resulta aparente también que el cromosoma bacteriano es circular —hecho que se deducía tambié[n] los datos genéticos descritos anteriormente (Cap. 7)—.

Durante el segundo ciclo de replicación, se vieron realm[ente] las horquillas predichas por el modelo. Además, la densida[d] granos en los tres segmentos era tal que podía interpreta[rse] como aparece en la Figura 8-18. Cairns observó toda clas[e] tamaños en estos patrones autorradiográficos en forma de l[...] en correspondencia con el movimiento progresivo de la cre[...] llera de replicación, u horquilla, alrededor del anillo. For[mas] como las que aparecen en la Figura 8-18 se llaman **formas t[he]ta** (θ).

Replicación mediante el círculo rodante

La replicación de ciertas moléculas circulares, como las d[e] plásmidos y ciertos virus, se produce por el mecanismo re[...]

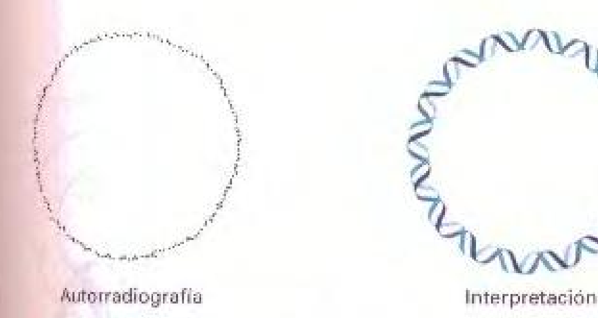


Figura 8-17. *Izquierda:* Autorradiografía de un cromosoma bacteriano después de un ciclo de replicación en timidina tritiada. Según el modelo de replicación semiconservativa, una de las dos cadenas debe ser radiactiva. *Derecha:* Interpretación de la autorradiografía. La línea azul claro representa la cadena tritiada.

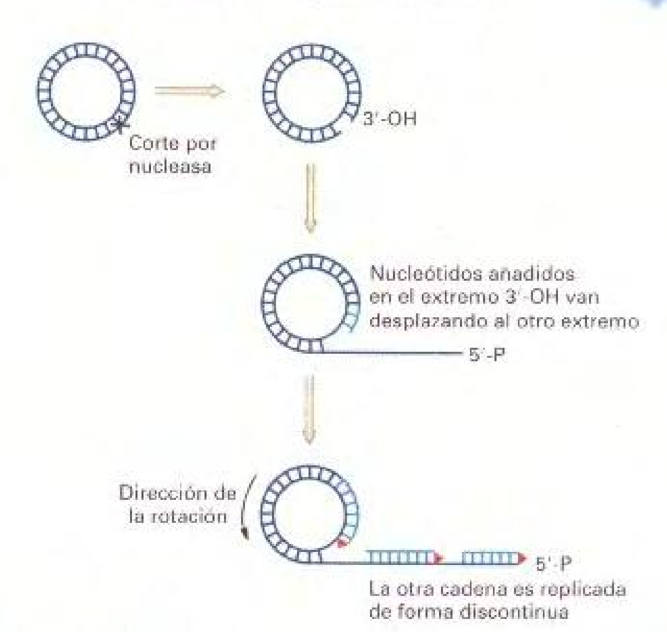


Figura 8-19. Replicación mediante el anillo rodante. El DNA sintetizado de nuevo es el de color azul. La cadena desplazada es utilizada para una replicación discontinua, como se describe en el texto. (Según D. L. Hartl y E. W. Jones, *Genetics: Principles and Analysis*, 4.ª ed. Jones and Bartlett, 1998.)

sentado en la Figura 8-19. Aquí, el corte mediante una nucleasa genera un extremo 3'-OH libre al que se van añadiendo los nucleótidos. Como se ve en la Figura 8-19, conforme progresa la síntesis, el otro extremo de la cadena es desplazado del círculo de doble cadena y luego copiado. Podemos imaginar este desplazamiento de la cadena como resultado de que el círculo fuera rodando. Como no hay un punto final de la replicación, la síntesis continúa a menudo más allá de una sola copia completa del círculo, generándose concadenados (serie de cadenas enlazadas), de tamaño equivalente a varios anillos completos, que serán procesados después por recombinación para generar círculos de tamaño normal.

El mecanismo de la replicación del DNA

Watson y Crick razonaron, en primer lugar, que el apareamiento de bases complementarias constituye la base de la fidelidad de la replicación del DNA; es decir, que cada base de la cadena molde determina la base complementaria de la nueva cadena. Sin embargo, actualmente sabemos que el proceso de replicación del DNA es muy complejo y que necesita de la participación de muchos componentes diferentes. Vamos a examinar cada uno de estos componentes y comprobar cómo actúan juntos para proporcionar el esquema actual de la síntesis de DNA en *E. Coli*, el sistema de replicación celular más estudiado. En la sección anterior, se introdujo el concepto de horquilla de replicación. La Figura 8-20 proporciona un esquema detallado del movimiento de la horquilla durante la replicación del DNA.

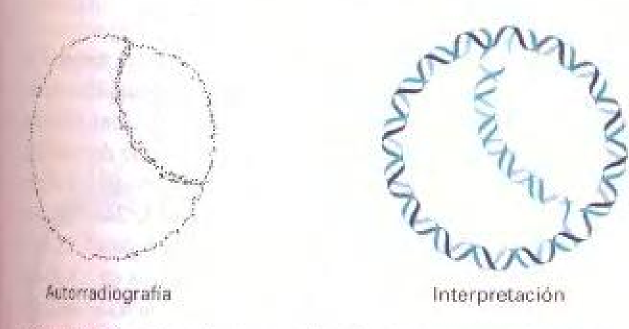


Figura 8-18. *Izquierda:* Autorradiografía de un cromosoma bacteriano durante el segundo ciclo de replicación en timidina tritiada. En esta estructura (Y), la hélice doble recién replicada que cruza el círculo podría contener ambas cadenas radiactivas (si la cadena parental fuera la radiactiva). *Derecha:* La doble densidad del trazado radiactivo del autorradiograma parece confirmar la interpretación que se hace aquí. Las hélices de color azul claro representan las cadenas «calientes».

Polimerasas de DNA

A finales de la década de 1950, Arthur Kornberg consiguió identificar y purificar la primera polimerasa de DNA, una enzima que cataliza la reacción de replicación:

$$\begin{matrix}\text{DNA parental} + \\ \text{(cebado)}\end{matrix} \left\{\begin{matrix}\text{dATP} \\ + \\ \text{dGTP} \\ + \\ \text{dCTP} \\ + \\ \text{dTTP}\end{matrix}\right\} \xrightarrow{\text{polimerasa de DNA}} \text{DNA replicado}$$

Esta reacción funciona sólo con la forma trifosfato de los nucleótidos (como el trifosfato de desoxiadenosina, o dATP). Al término de la reacción, la cantidad total de DNA puede ser hasta 20 veces la cantidad de DNA de entrada, de manera que el DNA presente al final debe ser fundamentalmente DNA replicado. La Figura 8-21 ilustra la reacción de elongación de la cadena, o reacción de **polimerización**, catalizada por las polimerasas de DNA. Ahora sabemos que en *E. coli* hay tres polimerasas de DNA.

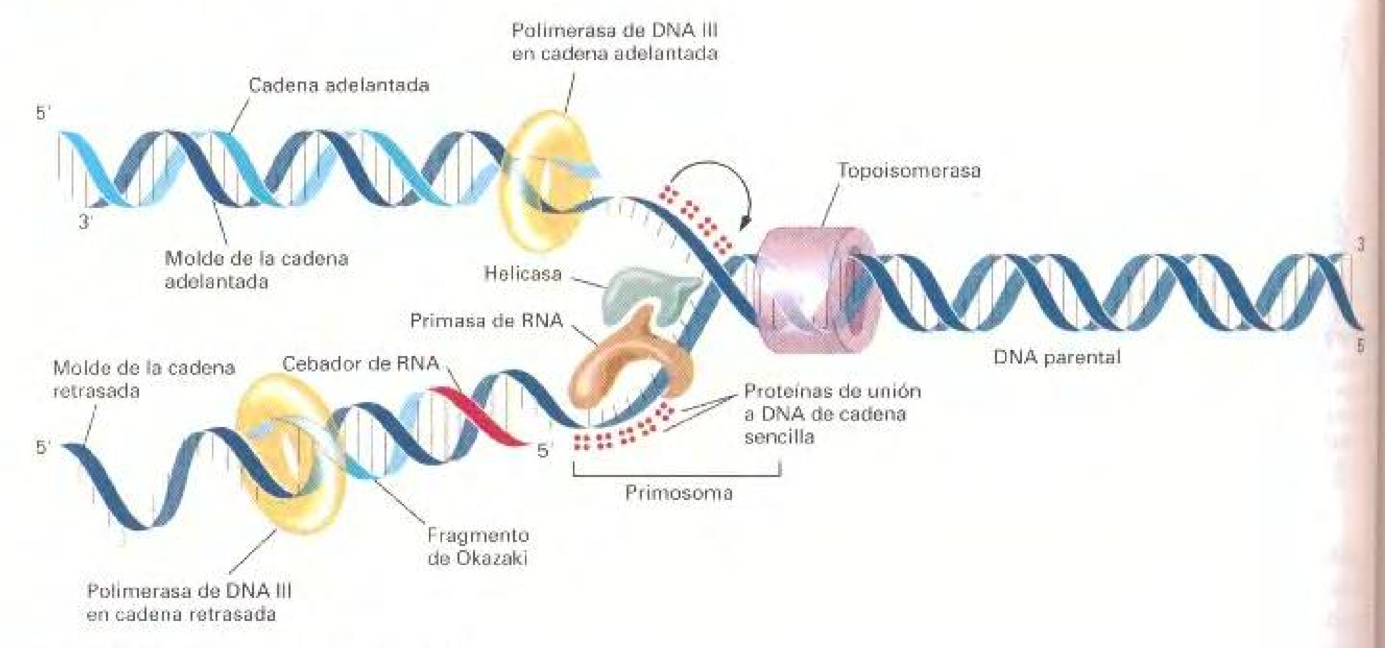


Figura 8-20. Horquilla de replicación del DNA.

La primera enzima purificada por Kornberg se denomina **polimerasa de DNA I** o **pol I**. Esta enzima posee tres actividades que parecen localizarse en tres regiones distintas de la molécula:

1. una actividad polimerasa que cataliza la elongación de la cadena en dirección 5′ → 3′;
2. una actividad exonucleasa 3′ → 5′ que elimina bases mal apareadas; y
3. una actividad exonucleasa 5′ → 3′ que degrada DNA de doble cadena

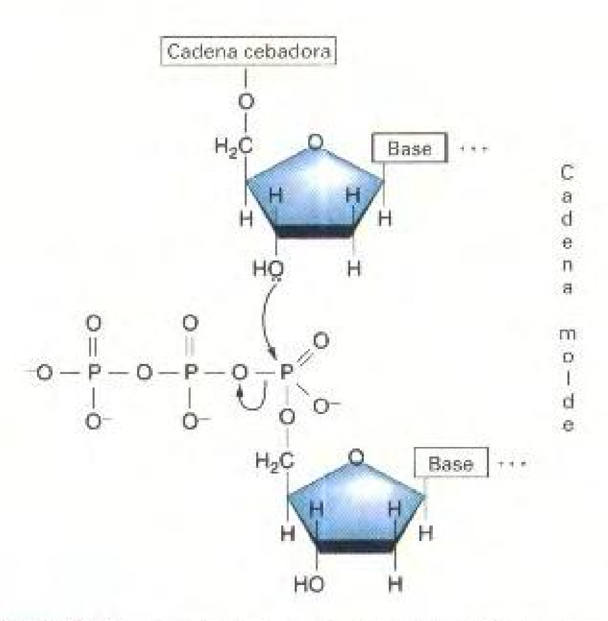


Figura 8-21. Reacción de elongación de la cadena catalizada por la polimerasa de DNA. (Tomado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.»

Posteriormente, se identificaron en *E. coli* dos polimerasas adicionales, pol II y pol III. A la enzima pol II no le ha sido asignado un papel concreto, aunque quizás repare daños del DNA. Pol III, junto con pol I, tiene un papel en la replicación del DNA de *E. coli* (Fig. 8-20). El complejo completo, u **holoenzima**, de pol III contiene al menos 20 subunidades polipeptídicas distintas, aunque el «cuerpo central» catalítico está formado sólo por tres subunidades, alfa (α), epsilon (ε) y theta (θ). El complejo pol III completará la replicación de una molécula de DNA de cadena sencilla si ya hay presente al menos un tramo pequeño de doble cadena. El pequeño oligonucleótido que forma ese tramo de doble cadena se denomina **cebador**.

Orígenes de replicación procarióticos

En *E. coli*, la replicación se inicia en un punto de **origen** fijo pero progresa luego **bidireccionalmente** (con horquillas en movimiento a ambos extremos de la zona en replicación), tal como aparece en la Figura 8-22, terminando en un punto denominado **término**. El origen único se llama ***oriC*** y está situado en el minuto 83 del mapa genético. Tiene una longitud de 245 pb y contiene varios elementos, como se muestra en la Figura 8-23. Primero hay una serie de secuencias casi idénticas de 13 pb en tándem, una a continuación de otra. Hay también una serie de sitios de unión de una proteína, la proteína DnaA. Un paso inicial de la síntesis de DNA es el desenrollamiento del DNA en el origen, en respuesta a la unión de la proteína DnaA. El resultado de la replicación bidireccional puede verse en la Figura 8-24, que ofrece una visión más completa de la replicación del DNA.

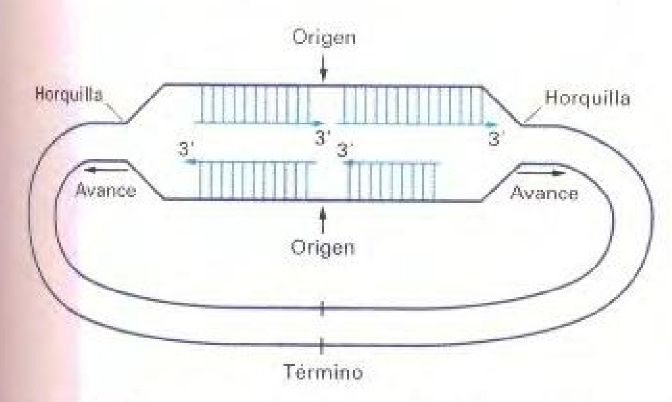


Figura 8-22. Diagrama de la replicación del DNA avanzando en las dos direcciones a partir del origen. (Tomado de A. Kornberg, *DNA synthesis*. Copyright © 1974, de W.H. Freeman and Company.)

Orígenes de replicación eucarióticos

Bacterias como *E. coli* emplean normalmente 40 minutos en cada ciclo de replicación-división celular, pero los en eucariotas, la duración del ciclo varía desde las 1.4 horas de la levadura hasta las 24 horas de las células animales en cultivo, pudiendo durar de 100 a 200 horas en algunos casos. Los eucariotas tienen que resolver el problema de coordinar la replicación de más de un cromosoma, debiendo además replicar la compleja estructura del propio cromosoma (véase la descripción de la estructura cromosómica del Cap. 3).

En los eucariotas, la replicación progresa a partir de múltiples puntos u orígenes. Ello puede demostrarse mediante un experimento en el que exponemos brevemente una célula eucariótica a timidina-(H^3), paso denominado **pulso**, y añadimos luego timidina «fría» (no marcada) en exceso, paso denominado **caza**; se extrae entonces el DNA y se hace una autorradiografía. La Figura 8-25 muestra el resultado del experimento, con lo que parecen ser distintos tramos de la molécula de DNA replicándose simultáneamente. La replicación parece comenzar en diferentes sitios de estos cromosomas eucarióticos. Un experimento similar de pulso, caza y autorradiografía de la replicación de los cromosomas politénicos (gigantes) de *Drosophila* revela muchas regiones en replicación dentro de un mismo brazo cro-

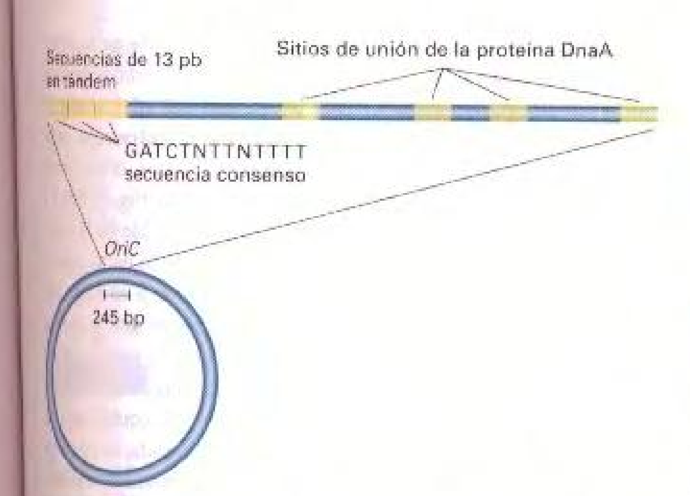


Figura 8-23. El origen de replicación de *E. coli*, *oriC*, tiene una longitud de 245 pb. Contiene tres secuencias casi idénticas de 13 nucleótidos, dispuestas en tándem, y cuatro sitios de unión de la proteína DnaA.

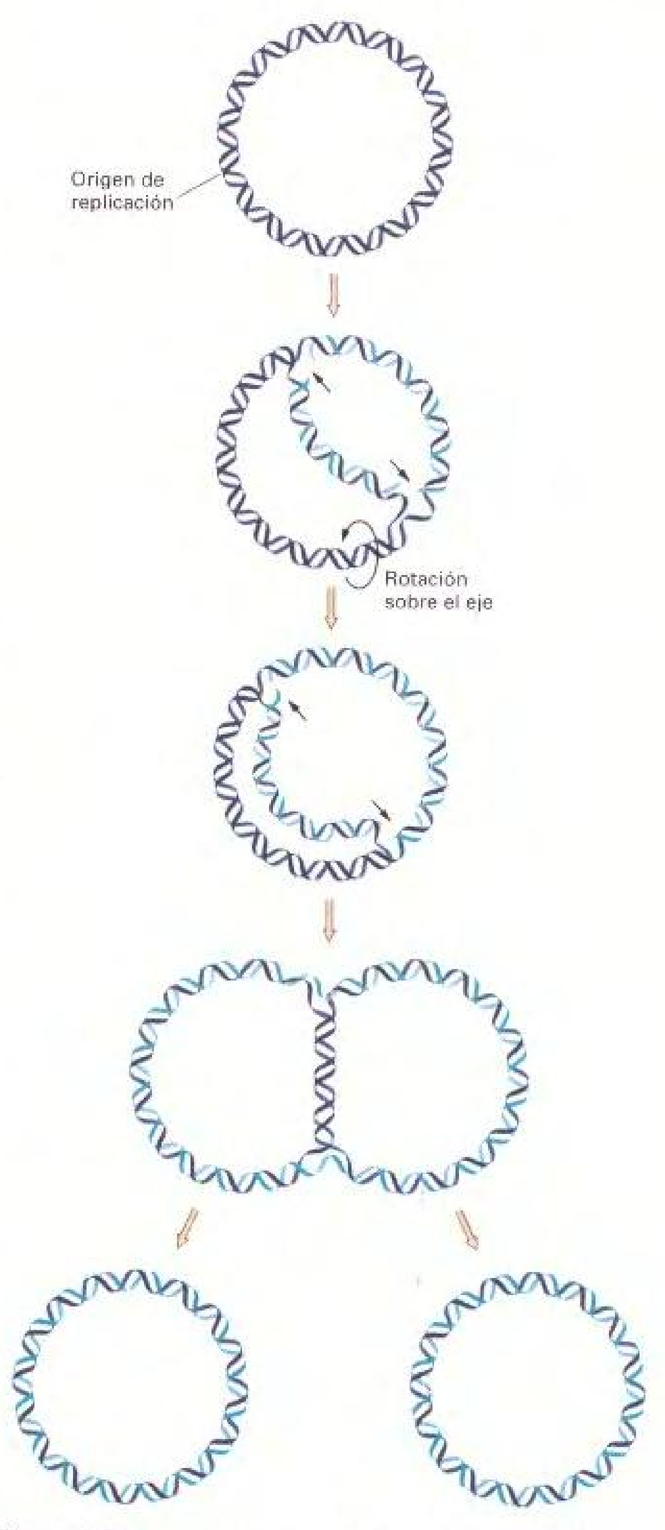


Figura 8-24. Replicación bidireccional de una molécula de DNA circular.



Figura 8-25. Una forma de replicación del DNA, revelada por autorradiografía. Una célula es expuesta brevemente a timidina -(^{3}H) (pulso) y transferida luego a timidina no radioactiva (fría) en exceso (caza). Se extiende el DNA sobre un portaobjeto y se autorradiografía. Según la interpretación que se muestra, habría varios puntos de replicación en una misma hélice doble de DNA.



Figura 8-26. Forma de replicación de un cromosoma de *Drosophila* revelada por autorradiografía. En un mismo cromosoma se ven varios puntos de replicación, señalados con flechas.

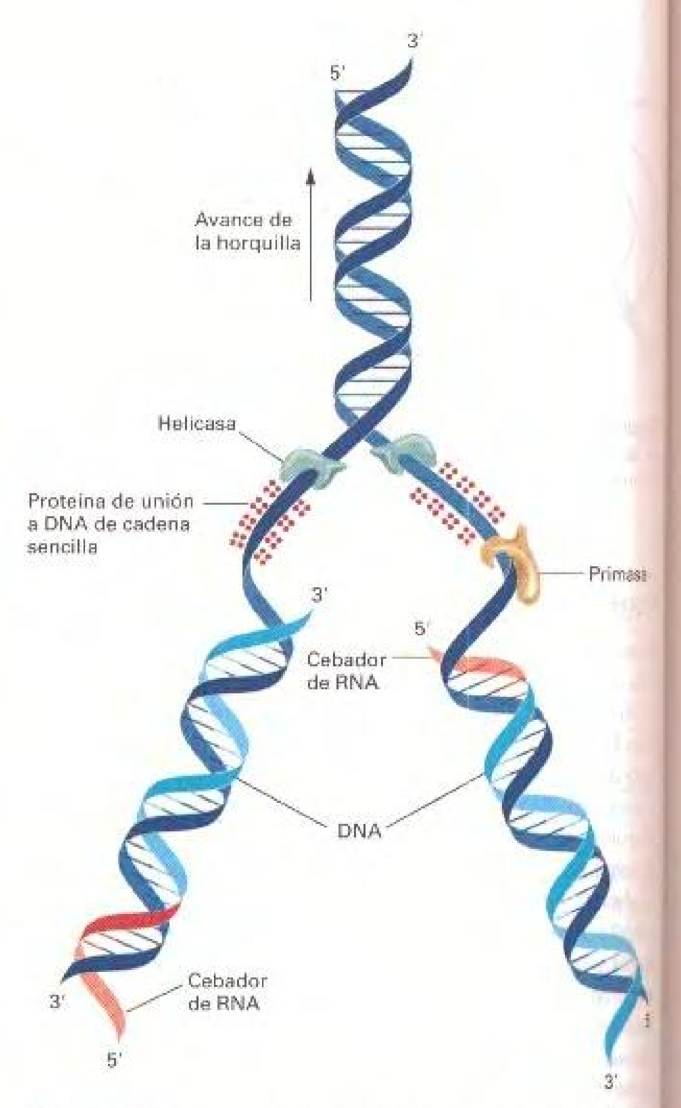


Figura 8-27. Iniciación de la síntesis de DNA mediante un cebador de RNA.

mosómico (Fig. 8-26). Así y todo, no hay una prueba contundente de que estas regiones correspondan en realidad a diferentes puntos de iniciación de una única molécula de DNA. Sin embargo, experimentos realizados con la levadura indican la existencia de unos 400 orígenes de replicación distribuidos a lo largo de los 17 cromosomas de ese organismo, y en humanos se estima que existen más de 10 000 horquillas de replicación.

Iniciación de la síntesis de DNA

Las polimerasas de DNA pueden alargar una cadena, pero no iniciar su síntesis. Por tanto, como ya se ha comentado, la síntesis de DNA debe iniciarse a partir de un cebador, un corto oligonucleótido que genera un tramo de DNA de dos cadenas. La acción del cebador en la replicación del DNA puede verse en la Figura 8-27 (véase también la Fig. 8-20). Los cebadores, de RNA, son sintetizados bien por la polimerasa de RNA o bien por una enzima denominada **primasa**. Ésta sintetiza un fragmento corto de RNA (de unos 30 pb de largo) complementario de un tramo específico del cromosoma. La cadena es alargada luego como DNA por la polimerasa de DNA. La primasa de *E. coli* forma un complejo con el DNA molde y otras proteínas adicionales, como DnaB, DnaT, Pri A, Pri B y Pri C. El complejo completo recibe el nombre de **primosoma** (véase Fig. 8-20).

Las cadenas adelantada y retrasada

Las polimerasas de DNA sintetizan cadenas nuevas sólo en dirección 5' → 3' y, por tanto, dado el antiparalelismo de la molécula de DNA, se desplazan *sobre la cadena molde* en la dirección 3' → 5' de ésta. Como consecuencia de esta polaridad, mientras una de las cadenas nuevas, la **cadena adelantada**, se fabrica de forma continua, la otra, la **cadena retrasada**, debe fabricarse de forma discontinua, a pequeños trozos, como puede observarse en la Figura 8-28 (véase también la Fig. 8-20). La adición de nucleótidos a lo largo de la cadena molde de la cadena retrasada debe producirse hacia el extremo 5' de dicha cadena molde (porque la replicación *siempre* progresa a lo largo del molde en la dirección 3' → 5' de éste, de manera que la cadena nueva crezca en dirección 5' → 3'). Así pues, la nueva cadena debe crecer en dirección opuesta al movimiento de la horquilla de replicación. Conforme el movimiento de la horquilla expone una nueva sección del molde de la cadena retrasada, se inicia un nuevo tramo de cadena retrasada que crece alejándose de la horquilla hasta que se para en el fragmento anterior. En *E. coli*, la pol III lleva a cabo la mayor parte de la síntesis de ambas cadenas del DNA, y la pol I rellena los huecos dejados en la caden

Figura 8-28. La síntesis de DNA se produce de forma continua en la cadena adelantada y discontinua en la cadena retrasada.

retrasada, que son luego sellados por la enzima **ligasa de DNA**. La ligasa de DNA une trozos sueltos de DNA catalizando la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' fosfato de un nucleótido emparejado a su complementario y un grupo 3' OH adyacente, como se muestra en la Figura 8-29. Es la única enzima capaz de sellar cadenas de DNA. La Figura 8-30 muestra la síntesis de la cadena retrasada y la reparación de huecos en detalle. Los cebadores necesarios para la síntesis discontinua de la cadena retrasada son fabricados por la primasa (paso «a»). Luego son alargados por la polimerasa de DNA (paso «b») apareciendo fragmentos de DNA que fueron detectados por primera vez por Reiji Okazaki y se denominan por ello **fragmentos de Okazaki**. La actividad exonucleasa 5' → 3' de la enzima pol I elimina los cebadores (paso «c»), y la misma enzima rellena con

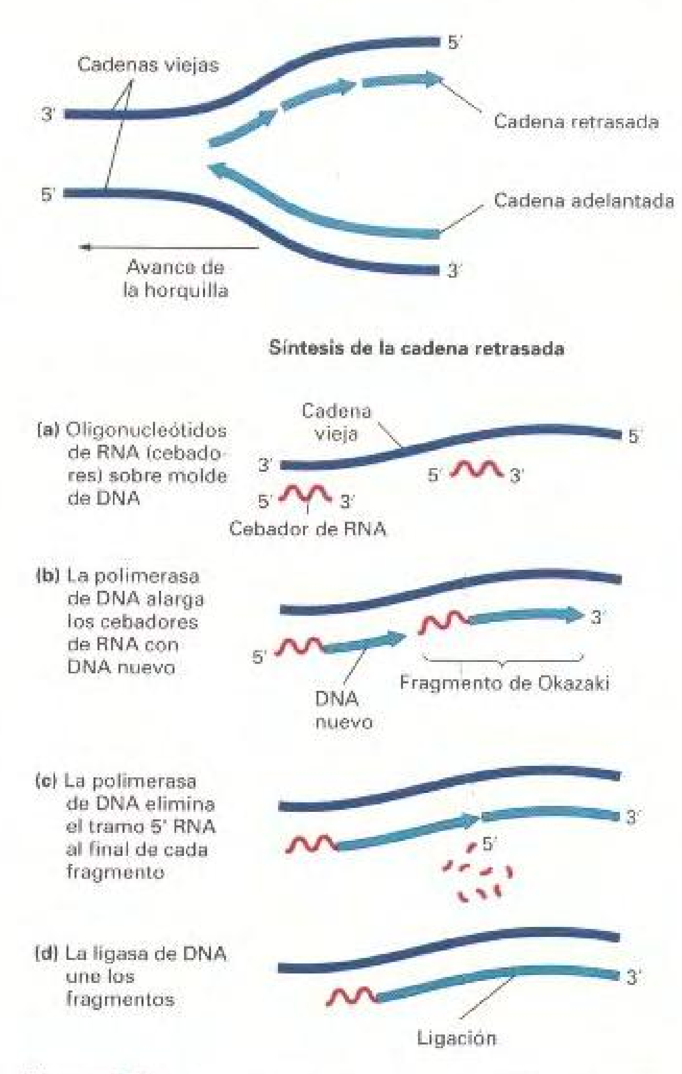


Figura 8-29. La reacción catalizada por la ligasa de DNA (Enz) une el extremo 3'-OH de un fragmento al extremo 5' fosfato del fragmento adyacente. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)

Figura 8-30. Esquema general de una horquilla de replicación (*arriba*) y pasos sucesivos de la síntesis de la cadena retrasada. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)

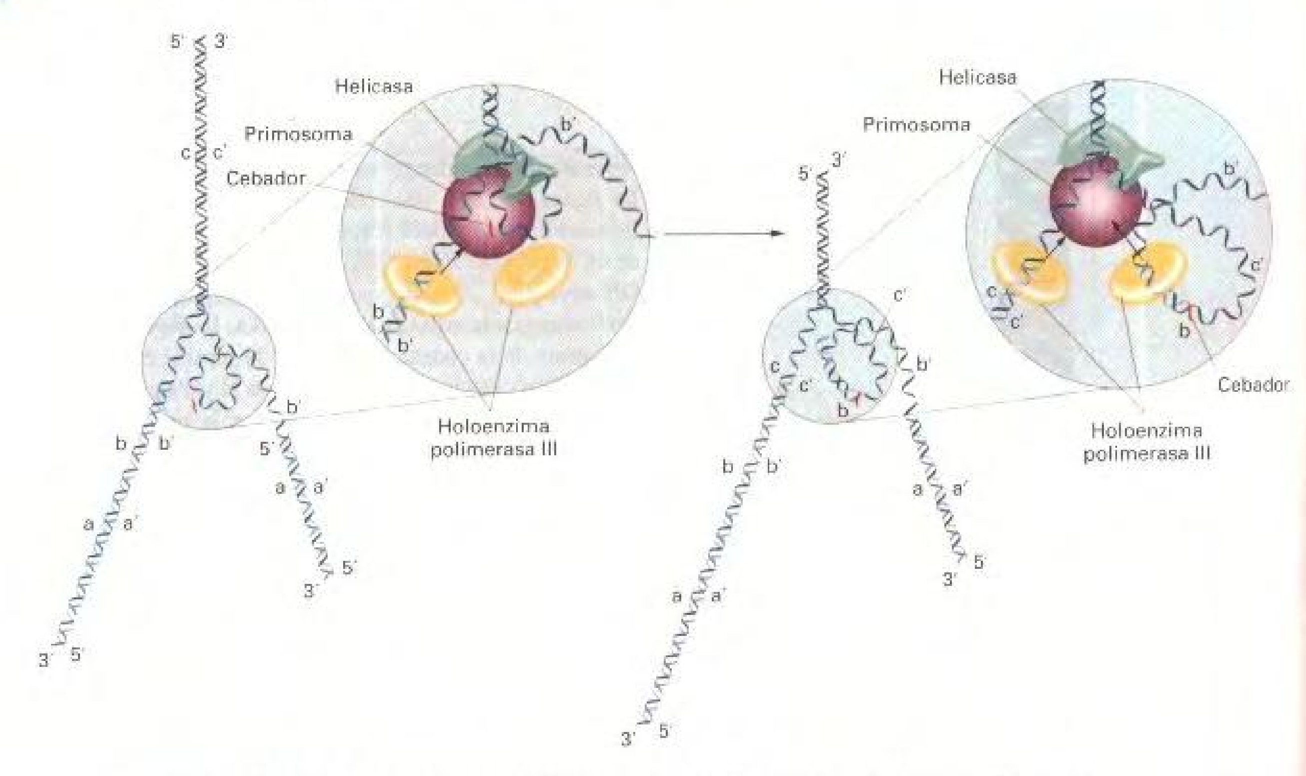


Figura 8-31. Un lazo en la cadena molde de la cadena retrasada permite que un dímero de la holoenzima polimerasa III se sitúe en la horquilla de replicación y fabrique las dos cadenas hermanas. (Cortesía de A. Kornberg. Tomado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.)

DNA los huecos, que son sellados por la ligasa de DNA (paso «d»). La Figura 8-31 muestra un mecanismo propuesto para permitir que una misma molécula dimérica de la holoenzima participe en la síntesis tanto de la cadena adelantada como de la cadena retrasada. Dicho mecanismo propone la formación en la cadena molde de la cadena retrasada de un lazo que permite a un único dímero de la enzima pol III generar ambas cadenas hermanas. Tras avanzar unos 1000 pares de bases, la enzima pol III soltaría al segmento de doble cadena retrasada, dejando que se forme un nuevo lazo.

Replicación de los extremos de los cromosomas

Los extremos de los cromosomas crean un problema especial para el proceso de replicación. La Figura 8-32 presenta dicho problema. Considerando a la cadena adelantada, la extensión del polinucleótido durante la replicación puede llegar siempre al extremo sin problemas, ya que viene cebada desde atrás. La cadena retrasada, sin embargo, alcanza un punto en su extremo sobre el que su modo de cebar con RNA no puede actuar, queda un tramo sin polimerizar y se produciría un acortamiento del cromosoma. Para resolver este problema, los extremos de los cromosomas, llamados **telómeros**, contienen repeticiones en tándem de secuencias cortas de DNA. En el ciliado *Tetrahymena*, por ejemplo, la secuencia repetida es TTGGGG; en humanos, es TTAGGG. Estas repeticiones no determinan un producto proteico o un RNA, sino que juegan un papel definido en la replicación. Una

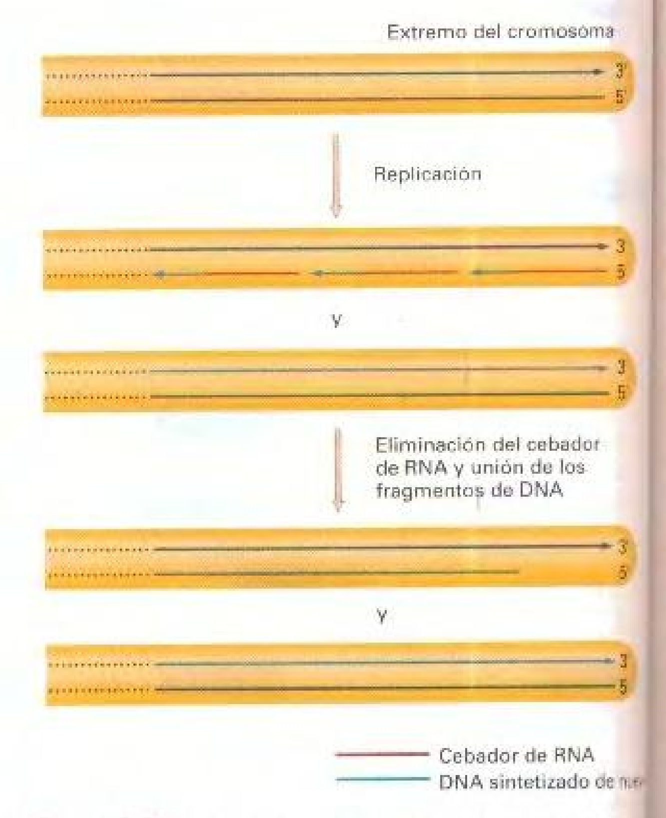


Figura 8-32. El problema de la replicación de los extremos de los cromosomas. No hay forma de «cebar» el último tramo de la cadena retras
el cromosoma se iría acortando.

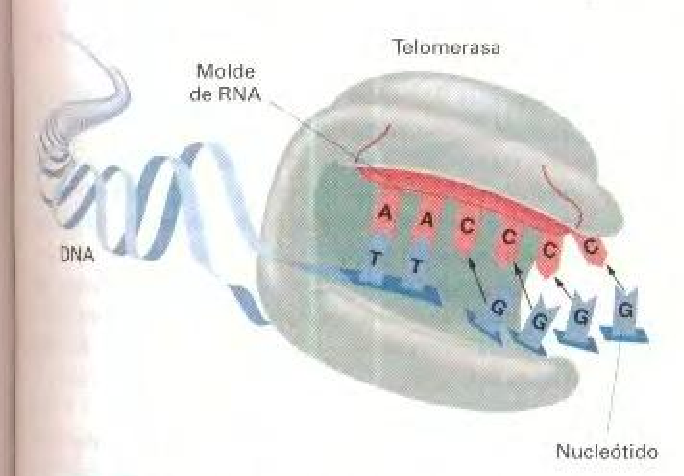


Figura 8-33. La telomerasa contiene una pequeña molécula de RNA que actúa como molde para la adición de una secuencia complementaria de DNA al extremo 3' de la hélice doble. En el ciliado *Tetrahymena*, la secuencia de DNA añadida es TTGGGG.

enzima llamada **telomerasa** añade esas secuencias cortas a los extremos de los cromosomas. La proteína telomerasa es un miembro de la clase de enzimas denominadas transcriptasas inversas, empleadas en situaciones especiales en las que se sintetiza DNA a partir de RNA. La telomerasa lleva una pequeña molécula de RNA, parte de la cual actúa como molde en la polimerización de la unidad telomérica repetida que se añade al extremo 3'. En *Tetrahymena*, por ejemplo, la secuencia en el RNA es 3'-AACCCC-5', que actúa como molde para la unidad telomérica repetida 5'-TTGGGG-3' (Fig. 8-33). El DNA adicional puede actuar entonces como molde para la síntesis de la cadena retrasada. Este proceso contrarresta la tendencia al acortamiento durante la replicación normal. La Figura 8-34 muestra las posiciones del DNA telomérico, reveladas mediante hibridación *in situ*. En varios tejidos somáticos humanos se ha demostrado acortamiento gradual con la edad de la longitud de los telómeros. Además, fibroblastos humanos en cultivo muestran un progresivo acortamiento telomérico hasta que finalmente mueren. Tales observaciones han llevado a la teoría telomérica del envejecimiento, cuya validez está siendo ahora sometida a comprobación.

Helicasas y topoisomerasas

Las **helicasas** son enzimas que rompen los puentes de hidrógeno que mantienen unidas en la doble hélice a las dos cadenas del DNA. La reacción requiere hidrólisis de ATP. Entre las helicasas de *E. coli* se encuentran las proteínas DnaB y Rep. La proteína Rep parece ayudar a desenrollar la hélice por delante de la polimerasa (véase la Fig. 8-20). El DNA desenrollado es estabilizado por la proteína SSB (del inglés, *single-stranded binding*) que se une a DNA de cadena sencilla e impide la regeneración de la doble hélice.

La acción de las helicasas durante la replicación genera retorcimientos del DNA circular que deben ser eliminados para que continúe la replicación. El DNA circular puede sufrir enrollamientos y retorcimientos, como los que pueden introducirse en



Figura 8-34. Cromosomas hibridados *in situ* con una sonda de DNA específica de telómeros que ha sido acoplada a un compuesto que, al microscopio, emite fluorescencia en amarillo. La sonda se une a ambos extremos de cada cromátida hermana. En la parte inferior de la fotografía aparece un núcleo intacto. (Robert Moyzis.)

una gomilla. Los **superenrollamientos** son generados y eliminados por enzimas denominadas **topoisomerasas**, una de las cuales es la llamada girasa de DNA (Fig. 8-35). Las topoisomerasas pueden también generar (*concadenar*) o eliminar (*desencadenar*) nudos o enlaces en una cadena. Hay dos tipos básicos de topoisomerasas. Las enzimas de tipo I provocan una incisión en una de las cadenas del DNA de doble cadena. Las enzimas de tipo II provocan la rotura de ambas cadenas. En *E. coli*, las enzimas topo I y topo III son ejemplos de enzimas de tipo I, mientras que la girasa es una enzima de tipo II.

El desenrollamiento de las cadenas de DNA para abrir la horquilla de replicación genera retorcimientos extras en otras regiones, y el superenrollamiento relaja la tensión de esos retorcimientos (Fig. 8-36). La girasa es necesaria para eliminar superenrollamientos positivos generados por delante de la horquilla de replicación.

Corrección mediante exonucleasa

Tanto la polimerasa de DNA I como la polimerasa de DNA III poseen una actividad exonucleasa 3' → 5' que funciona como «lectora» y «correctora de pruebas», detectando apareamientos incorrectos que se hayan introducido erróneamente durante la

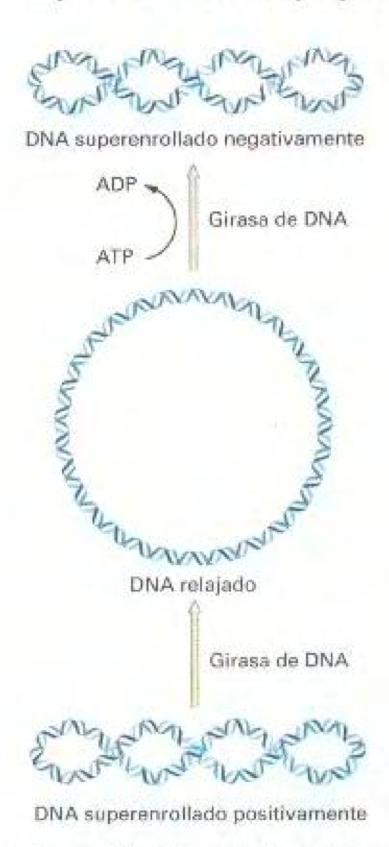


Figura 8-35. Superenrollamiento catalizado por la girasa de DNA. La replicación del DNA genera superenrollamientos «positivos», que aparecen en la parte inferior del dibujo, debidos a la rotación rápida del DNA en la horquilla de replicación. La girasa abre y cierra enlaces fosfodiésteres, relajando así el superenrollamiento, tal como aparece aquí (DNA relajado). La girasa también puede generar superenrollamientos en la dirección contraria, llamados superenrollamientos *negativos*; estos últimos facilitan la disociación de la doble hélice. (Según L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed., Copyright © 1995, de Lubert Stryer.)

polimerización y eliminándolos. La actividad correctora de la enzima pol III se localiza en la subunidad ε, que debe estar unida a la subunidad α para realizar su función correctora con máxima eficacia (Fig. 8-37). Las estirpes que carecen de una subunidad ε activa muestran una mayor tasa de mutación (véase Cap. 16). La Figura 8-38 muestra la eliminación de un residuo de citosina que ha sido emparejado erróneamente con una adenina. Como puede observarse, la hidrólisis se produce en el extremo 5′ de la base mal apareada: la eliminación de una base incorrecta deja el grupo 3′-OH de la base precedente, sobre el que puede ahora continuar libremente el crecimiento de la cadena, aceptando el nucleósido trifosfatado correcto (timidina, en este caso).

Observe que esta actividad exonucleasa se produce sobre el extremo 3′ de la cadena en crecimiento (es, por tanto, 3′ → 5′). La necesaria coordinación de la actividad exonucleasa con la elongación de la cadena ayuda a explicar por qué la replicación va en dirección 5′ → 3′. Como vimos anteriormente, las nuevas bases se añaden cuando el grupo 3′ OH de la última desoxirribosa de la cadena en crecimiento ataca al fosfato de alta energía del nucleósido trifosfatado que va a ser añadido (véase Figura 8-21). Así se produce el crecimiento 5′ → 3′. Es concebible que la replicación fuera en dirección 3′ → 5′ (en la Fig. 8-21, el trifosfato 5′ de la parte inferior sería la última base de la cadena, y el 3′ OH que lo atacaría sería el del nucleósido trifosfatado a ser añadido a la cadena). Sin embargo, si la replicación fuera en esta dirección, las escisiones de la exonucleasa deberían producirse sobre el extremo 5′ de la cadena. Cuando fuera eliminada una base mal apareada, quedaría un grupo 5′ OH al final de la cadena en crecimiento. El grupo 3′ OH del nuevo nucleósido trifosfatado que debe incorporarse ahora se encontraría con ese grupo 5′ OH, en vez de con el 5′ trifosfato de alta energía necesario para la formación del enlace. Éste no se formaría y la elongación de la cadena se pararía. Por eso la replicación no va en dirección 3′ → 5′.

Polimerasas de DNA eucarióticas

En eucariotas superiores se encuentran al menos cinco polimerasas de DNA, α, β, γ, δ y ε. Las polimerasas del núcleo α y δ ejercen papeles similares a la pol I de *E. coli*. La polimerasa β actúa en la reparación del DNA y en el relleno de huecos. La polimerasa γ se encuentra en las mitocondrias y parece tomar parte en la replicación del DNA mitocondrial.

Aplicaciones experimentales de la complementariedad entre secuencias de bases

En 1960, Paul Doty y Julius Marmur observaron que al calentar el DNA a 100 °C se deshacen todos los puentes de hidrógeno entre las dos cadenas complementarias, y el DNA pasa a ser de cadena sencilla (Fig. 8-39). Si la solución se enfría lentamente, vuelve formarse DNA de cadena doble. Este proceso de **reasociación** ocurre cuando dos cadenas colisionan de tal manera que las secuencias de bases complementarias se alinean y reconstruyen la hélice doble original. Como se muestra en la Figura 8-39, la reasociación de cadenas complementarias es muy específica y ello constituye la base de muchas técnicas importantes en la

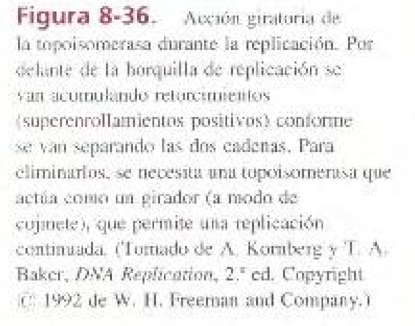
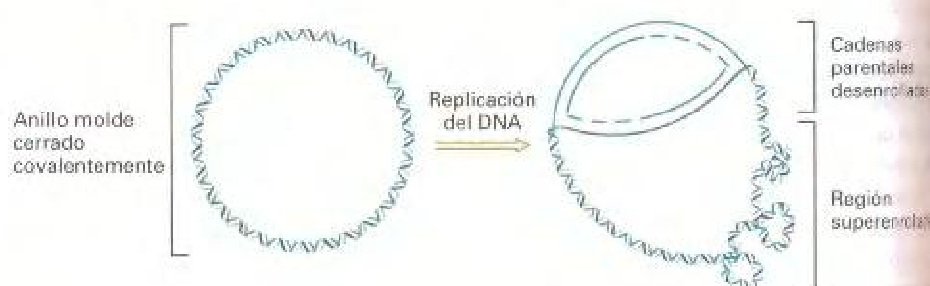


Figura 8-36. Acción giratoria de la topoisomerasa durante la replicación. Por delante de la horquilla de replicación se van acumulando retorcimientos (superenrollamientos positivos) conforme se van separando las dos cadenas. Para eliminarlos, se necesita una topoisomerasa que actúa como un girador (a modo de cojinete), que permite una replicación continuada. (Tomado de A. Kornberg y T. A. Baker, *DNA Replication*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de W. H. Freeman and Company.)



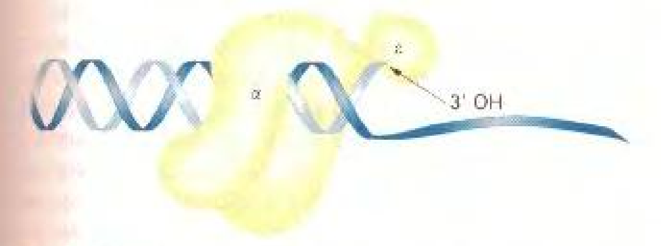


Figura 8-37. Corrección de pruebas del complejo pol III α-ε. (Tomado de A. Kornberg y T. A. Baker, *DNA Replication*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de W. H. Freeman and Company.)

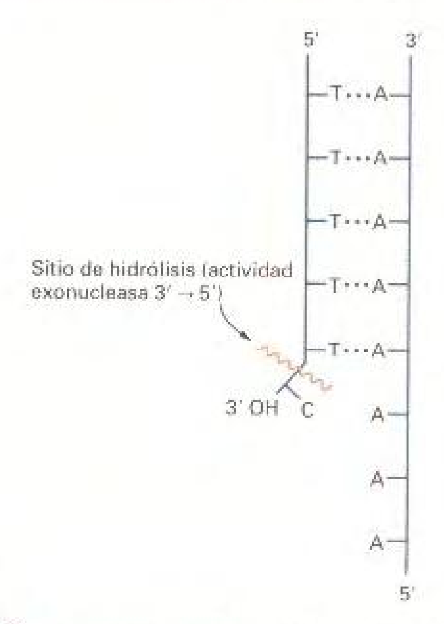


Figura 8-38. Acción exonucleasa 3' → 5' de la polimerasa III.

logía molecular, tales como la identificación de tramos específicos de DNA mediante hibridación y el aislamiento de fragmentos concretos de DNA empleados en clonación, como se explica en el Capítulo 12. La Figura 8-40*a* muestra un perfil cinético típico de la disociación del DNA con el aumento de la temperatura. A una temperatura característica de cada tipo de DNA, éste empieza a «desnaturalizarse». Se define la temperatura de fusión, T_m, como la temperatura a la que la mitad de las moléculas están desnaturalizadas en cadenas sencillas. La temperatura de fusión depende de la proporción de pares G : C, porque tales pares de bases establecen tres puentes de hidrógeno, mientras que los pares A : T se mantienen unidos por dos puentes de hidrógeno. Como aparece en la Figura 8-40*b*, cuanto mayor es la proporción de pares G : C, mayor es la temperatura de fusión.

El descubrimiento de Doty y Marmur de que, en solución, cadenas sencillas separadas de una hélice doble se enlazan unas con otras, debido al emparejamiento complementario de sus bases, llevó a diversas aplicaciones experimentales que han tenido un efecto enorme en la investigación en Genética molecular.

1. *Análisis de la estructura genómica.* Si se disocia DNA genómico total y luego se le deja renaturalizar, se observan distintas fases en el proceso de reasociación. Hay una fase inicial de reasociación muy rápida. Esta fase corresponde al DNA muy repetido, porque existen muchas copias por genoma de ese DNA. Estas copias se encuentran unas a otras con más rapidez que los genes únicos, presentes en una sola copia por genoma haploide. Las fracciones que luego van reasociándose progresivamente contienen DNA cada vez menos repetido, reasociándose al final las secuencias únicas. Este comportamiento permitió a los científicos aislar y caracterizar las distintas clases de DNA repetido. Tal caracterización permitió, a su vez, caracterizar de forma general genomas de organismos de la mayoría de los grupos taxonó-



Figura 8-39. Desnaturalización y renaturalización de moléculas de DNA de doble cadena.

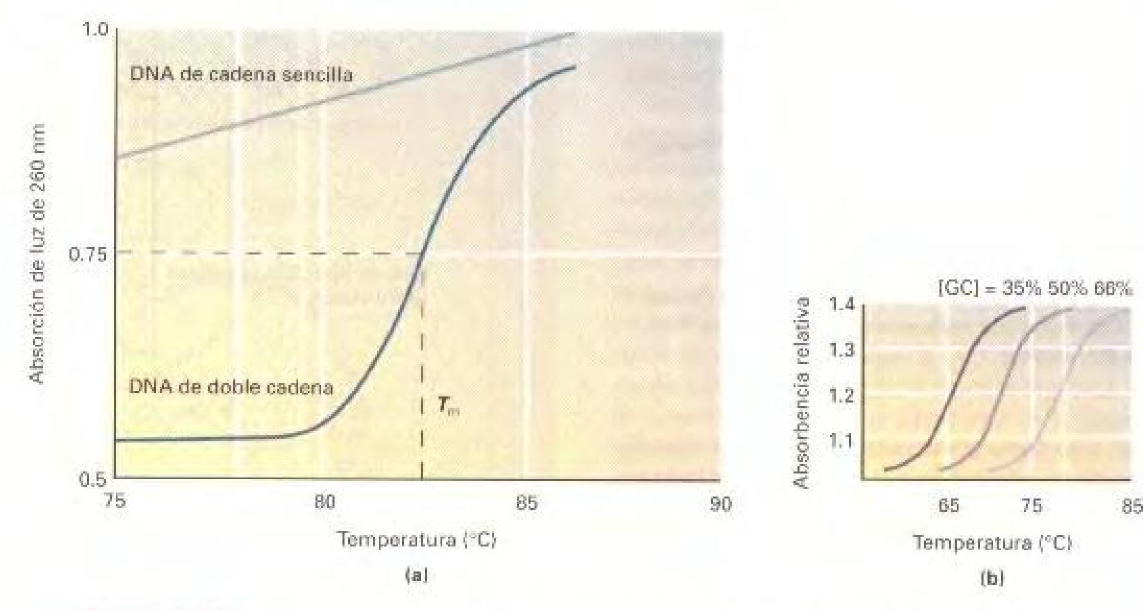


Figura 8-40. (a) Absorción de luz ultravioleta (longitud de onda de 260 nm) de soluciones de DNA de cadena sencilla y de doble cadena. Conforme se van disociando tramos de DNA de doble cadena, la absorción de esos tramos aumenta casi dos veces. La temperatura a la que la mitad de las bases del DNA de doble cadena se han desnaturalizado se denomina T_m. (b) Curvas de desnaturalización de DNA. Se representa la absorbencia relativa a la de 25 °C frente a la temperatura. (La longitud de onda de la luz incidente era de 260 nm.) La T_m del DNA de *E. coli* es 69 °C (50 % de pares GC) y 76 °C la del DNA de *Pseudomonas aeruginosa* (68 % de pares GC). (Parte «b» tomada de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © de Lubert Stryer.)

micos, ofreciendo otra estrategia de comparación evolutiva al nivel genético.

2. *Aislamiento de genes.* Muchos de los métodos para aislar genes (clonación de genes, véase Cap. 12) están basados en la hibridación de DNA por complementariedad de bases. El método más común aprovecha un fragmento de DNA desnaturalizado radiactivo, que se emplea como sonda para encontrar un clon con un gen concreto de interés en una mezcla de clones representativa de todo el genoma.

3. *Técnicas de hibridación de Southern y Northern.* Vimos en el Capítulo 1 que puede emplearse una sonda desnaturalizada radiactiva para identificar fragmentos genómicos concretos en una mezcla fraccionada en un gel de electroforesis (técnica de hibridación de Southern); con una técnica paralela, podemos detectar transcritos de RNA específicos en un gel de electroforesis (técnica de hibridación Northern). Dado al poder de resolución de estas técnicas, hoy día forman parte del repertorio metodológico empleado diariamente por genetistas de todo el mundo.

4. *Cartografía cromosómica.* La hibridación con sondas ha permitido la identificación de *marcadores de DNA* en posiciones cromosómicas concretas. [Un tipo de marcador de DNA es el polimorfismo del tamaño de fragmentos de restricción (RFLP); véase el Cap. 13]. Los marcadores de DNA han aportado muchos miles de nuevos loci con los que saturar el mapa cromosómico. Además, algunos de ellos son marcadores ligados a alelos de enfermedades hereditarias humanas, permitiendo su diagnosis. En una técnica relacionada, puede añadirse una sonda marcada a DNA parcialmente desnaturalizado y todavía en forma de cromosoma para revelar la posición cromosómica del DNA homólogo a dicha sonda (hibridación *in situ*, véase el Cap. 14).

Vemos, por tanto, que la estructura del DNA ofrece no sólo dos propiedades críticas para su función biológica (replicación y depósito de información), sino también técnicas que resultan claves para la disección genética de los organismos y sus células.

COROLARIO

La especificidad de la complementariedad de las bases constituye el fundamento de la continuidad de la vida, vía replicación del DNA, y el fundamento del flujo de información del DNA a la proteína: determinante principal de la forma biológica. Esa misma especificidad es empleada por los genetistas como instrumento para investigar la estructura y función génica y genómica.

RESUMEN

El trabajo experimental sobre la naturaleza molecular del material hereditario ha demostrado de forma concluyente que el material genético es DNA (no proteína, RNA u otra sustancia). Empleando datos obtenidos por otros investigadores, Watson y Crick propusieron un modelo de hélice doble, con dos cadenas enrolladas entre sí y que corren de forma antiparalela. La espe-

ficidad de la unión de las dos cadenas está basada en el acoplamiento entre adenina (A) y timina (T) y entre guanina (G) y citosina (C). El primer par de bases se mantiene mediante dos puentes de hidrógeno, el segundo mediante tres.

El modelo de Watson y Crick descubre cómo el DNA puede replicarse en forma ordenada, un requirimiento esencial del material genético. La replicación se lleva a cabo de forma semiconservativa tanto en procariotas como en eucariotas. Una hélice doble es replicada en dos hélices idénticas, con la misma secuencia lineal de nucleótidos; cada una de las dos hélices dobles nuevas está formada por una cadena de DNA vieja y otra polimerizada de nuevo.

La replicación se lleva a cabo con la ayuda de varias enzimas, incluyendo polimerasa de DNA, girasa y helicasa. Se inicia en sitios especiales denominados orígenes de replicación y progresa a lo largo del DNA en ambas direcciones. Como la polimerasa de DNA actúa sólo en dirección 5' → 3', una de las cadenas nuevas de cada horquilla de replicación debe ser fabricada a trozos cortos que son unidos luego por la ligasa de DNA. La polimerización del DNA no puede iniciarse sin un pequeño cebador de doble cadena que es también fabricado por enzimas especiales.

Mapa de Conceptos

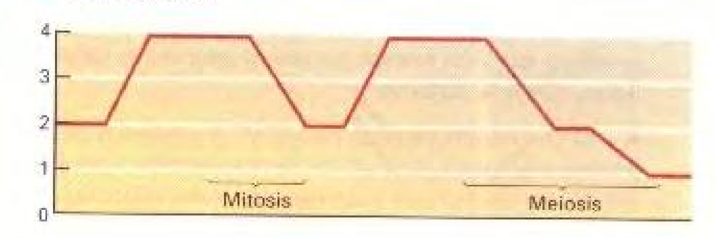
Trace un mapa de conceptos, relacionando entre sí tantos de los siguientes términos como le sea posible. Observe que los conceptos no están en ningún orden concreto.

hélice doble de DNA / nucleótidos / puentes de hidrógeno / semiconservativa / 5' / replicación / cromátida / mitosis / polimerasa de DNA / meiosis / fase S / gen / 3'

Problema de Integración de Capítulos

La mitosis y la meiosis se presentaron en el Capítulo 3. Teniendo en cuenta lo tratado en este capítulo sobre replicación de DNA, dibuje una gráfica que muestre el cambio con el tiempo del contenido en DNA de una célula que sufre mitosis y luego meiosis. Asuma que la célula es diploide.

♦ Solución ♦



Problemas Resueltos

1. Si una molécula de DNA contiene un 56 % de GC, ¿cuáles serán los porcentajes de cada una de las cuatro bases (A, T, G y C) de esa molécula?

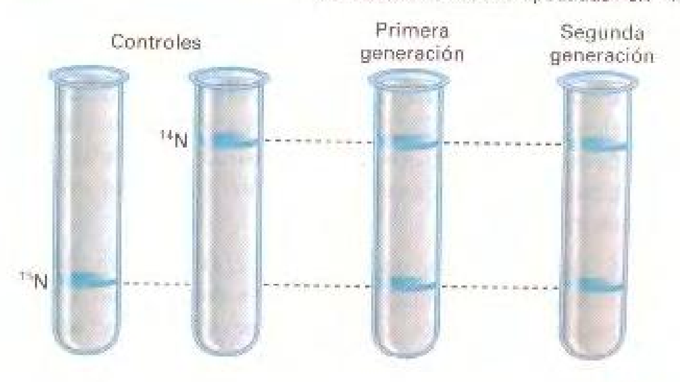
♦ Solución ♦

Si el contenido en GC es del 56 %, como G = C, el contenido de G es del 28 % y el de C del 28 %. El contenido de AT es 100 - 56 = 44 %. Como A = T, el contenido de A es del 22 %, y el de T del 22 %.

2. Describa el patrón de bandas esperado en el gradiente de CsCl del experimento de Meselson-Stahl en caso de replicación *conservativa*. Haga un dibujo.

♦ Solución ♦

Vea la Figura 8-13 para una explicación adicional. Si la replicación fuera conservativa, y la bacteria es cultivada en presencia de ^{15}N y luego en ^{14}N, después de la replicación, una molécula de DNA será toda ella de ^{15}N y la otra toda de ^{14}N, apareciendo en el gradiente una banda pesada y otra ligera. Después de la segunda generación, el DNA ^{15}N producirá una molécula hecha toda ella de ^{15}N y otra hecha toda ella de ^{14}N, mientras que la molécula hecha de ^{14}N producirá sólo DNA hecho de ^{14}N. Por tanto, de nuevo se generan dos tipos de DNA, uno hecho sólo de ^{15}N y otro sólo de ^{14}N, apareciendo de nuevo una banda pesada y otra ligera:



PROBLEMAS

1. Describa los tipos de fuerzas y enlaces químicos que operan en la hélice doble de DNA.

2. Explique qué significan los términos *replicación conservativa* y *semiconservativa*.

3. ¿Qué se entiende por un *cebador* y por qué son necesarios los cebadores en la replicación?

4. ¿Qué son las helicasas y las topoisomerasas?

5. ¿Por qué la síntesis de DNA es continua en una cadena y discontinua en la cadena opuesta?

6. Si la timina constituye el 15 % de las bases de una molécula concreta de DNA, ¿qué porcentaje de las bases serán citosinas?

7. Si una molécula de DNA contiene un 48 % de GC, ¿cuáles serán los porcentajes de las cuatro bases (A, T, G y C) de esa molécula?

8. Cromosomas de *E. coli* con cada átomo de nitrógeno marcado (esto es, cada átomo de nitrógeno es del isótopo pesado ^{15}N en vez del isotopo normal ^{14}N) se dejan replicar en un medio de cultivo en el que sólo hay ^{14}N. Usando una línea continua para representar la cadena polinucleotídica pesada, y una línea discontinua para representar la cadena ligera, dibuje lo siguiente:

   a. El cromosoma parental pesado y los productos de la primera replicación después de la transferencia a medio con ^{14}N, suponiendo que el cromosoma es una hélice doble de DNA y que la replicación es semiconservativa.

   b. Como en el apartado a, pero suponiendo que la replicación es conservativa.

   c. Como en el apartado a, pero suponiendo que el cromosoma está formado, en realidad, por dos hélices dobles pegadas lateralmente, cada una de las cuales se replica de forma semiconservativa.

   d. Como en el apartado c, pero suponiendo que cada una de las dos hélices pegadas se replica conservativamente y que la replicación del *cromosoma* en su conjunto es semiconservativa.

   e. Como en el apartado d, pero suponiendo que la replicación del cromosoma en su conjunto es conservativa.

   f. Si los cromosomas que se producen tras la primera división en ^{14}N se centrifugan en un gradiente de densidad de cloruro de cesio (CsCl) y aparece una sola banda, ¿cuáles de las posibilidades «a» a «e» podrían ser descartadas? Reconsidere el experimento de Meselson-Stahl: ¿qué *prueba* ahora?

9. R. Okazaki observó que si se extrae el DNA recién sintetizado y se desnaturaliza, los productos más tempranos de la replicación del DNA de *E. coli* incluyen fragmentos de unos 1000 nucleótidos. Si dejaba que la replicación se prolongara por un período de tiempo más largo, tras la extracción y desnaturalización observaba una menor proporción de esos fragmentos cortos y moléculas más largas de DNA de una cadena. Explique cómo se relacionan estos resultados con el hecho de que todas las polimerasas de DNA conocidas sintetizan DNA sólo en dirección 5′ → 3′.

10. Cuando se dan pulsos de timidina–(^3H) en diferentes momentos del ciclo celular de células vegetales o animales las regiones de heterocromatina de los cromosomas resultan ser invariablemente «de replicación tardía». ¿Podría sugerir un significado biológico de esta observación, si es que tiene alguno?

11. El DNA del planeta Rama está constituido por seis tipos de nucleótidos: A, B, C, D, E y F. A y B se llaman *marcinas*, C y D *orsinas*, y E y F *pirinas*. Para el DNA de Rama valen las reglas siguientes:

$$\text{Marcinas totales} = \text{orsinas totales} = \text{pirinas totales}$$
$$A = C = E$$
$$B = D = F$$

   a. Haga un modelo de la estructura del DNA de Rama.

   b. La mitosis en Rama produce tres células hijas. Teniendo esto en cuenta, haga un esquema de cómo ocurre la replicación de su modelo de DNA.

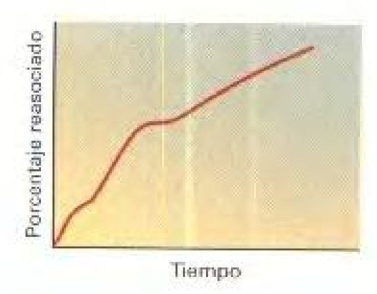
   c. Analice el proceso de la meiosis en Rama. ¿Qué comentarios o conclusiones puede hacer?

12. Si extrae el DNA del colifago ϕX174, descubrirá que se compone de un 25 % de A, un 33 % de T, un 24 % de G y un 18 % de C. ¿Tiene ésto algún sentido en relación con las reglas de Chargaff? ¿Qué interpretación daría a ese resultado? ¿Cómo replicaría su DNA un fago como éste?

13. La temperatura de desnaturalización de una muestra de DNA puede emplearse para estimar su proporción de pares de nucleótidos G—C. ¿Cuál puede ser el fundamento de esta estimación, y qué indicaría una temperatura alta de desnaturalización?

14. Supongamos que extrae el DNA de un virus pequeño, lo desnaturaliza y lo deja reasociarse con DNA extraído de otras cepas del virus que llevan bien una deleción, una inversión o una duplicación. ¿Qué esperaría encontrar si observara ahora las muestras al microscopio electrónico?

15. Desnaturalizamos por calor el DNA extraído de un mamífero y, para que se reasocie, lo enfriamos lentamente. La gráfica adjunta muestra los resultados obtenidos. La curva tiene dos «hombros». El primero indica la presencia de una fracción de DNA que se reasocia muy rápidamente —tan rápido, en realidad, que ocurre antes de que tenga lugar la interacción entre las cadenas sencillas—.



a. ¿Qué puede ser esa fracción del DNA?

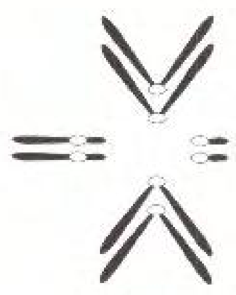
b. El segundo hombro también corresponde a una fracción de DNA que se reasocia rápidamente. ¿Qué sugiere este dato?

16. Diseñe un experimento para determinar la relación física entre las secuencias muy repetidas y las secuencias únicas de DNA sobre los cromosomas. (**Pista**: puede variarse el tamaño de las moléculas de DNA, variando la tensión mecánica a que las sometemos.)

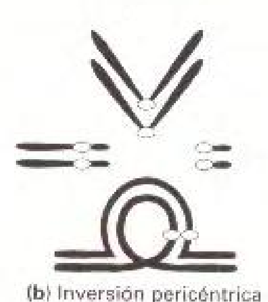
17. Se conocen virus que provocan cáncer en ratones. Cuenta con una preparación purificada de DNA viral, otra de DNA de los cromosomas de células cancerosas de ratón, y otra de los cromosomas de células normales. El DNA viral se reasocia específicamente con el DNA de las células cancerosas, pero no con el DNA de las células normales. Analice el posible significado genético de esta observación, sus implicaciones moleculares y su importancia médica.

18. Ruth Kavenaugh y Bruno Zimm diseñaron un procedimiento para medir la longitud máxima de las moléculas más largas de DNA en solución. Analizaron así muestras de DNA de los tres cariotipos de *Drosophila* que aparecen en la figura. Encontraron que las moléculas más largas de los cariotipos (a) y (b) eran de longitud similar, y alrededor del doble de la longitud de las moléculas más largas de (c). Interprete estos resultados.

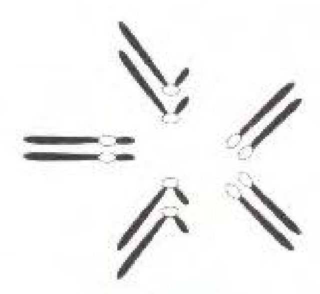
19. Utilice la técnica de los cromosomas en arlequín, dejando que transcurran *tres* rondas de replicación en bromodesoxiuridina y tiñendo luego los cromosomas. ¿Qué resultado espera obtener?



(a) Silvestre



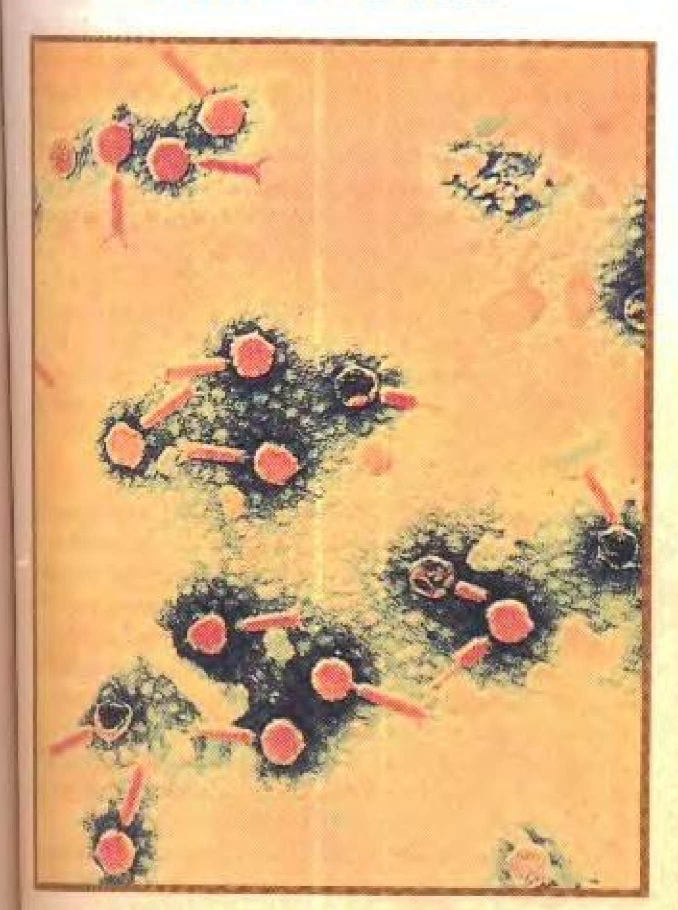
(b) Inversión pericéntrica



(c) Translocación

9

GENÉTICA DE LA FUNCIÓN DEL DNA



Fotografía coloreada de fagos no identificados, obtenida por microscopia de transmisión de electrones.
(Aumento: 58 000 ×). (*CNRI/Science Photo Library/Photo researchers*)

Ideas fundamentales

La hipótesis «una gen-una enzima» establece que los genes determinan la estructura de las proteínas.

Estudios realizados con las hemoglobinas han permitido asociar una mutación génica con un cambio específico en la secuencia de aminoácidos de una proteína.

La secuencia lineal de nucleótidos de un gen determina la secuencia lineal de aminoácidos de una proteína.

El análisis preciso de la estructura de los genes *rII* del fago T4 demostró que el gen consiste en una ristra de subelementos, identificados ahora con los pares de nucleótidos, que pueden mutar y recombinar entre sí.

Un gen puede definirse como una unidad de función mediante la prueba de complementación.

¿Cuál es la naturaleza del gen y de qué manera los genes condicionan los fenotipos? Por ejemplo, ¿cómo puede un alelo de un gen producir un guisante rugoso y otro un guisante liso? Hoy sabemos que todas las reacciones de una célula están catalizadas por enzimas, cuya conformación tridimensional es crucial para su función. También sabemos hoy que los genes especifican las estructuras de las proteínas, algunas de las cuales son enzimas, e incluso podemos relacionar la estructura del material genético con la estructura de las proteínas. El Cuadro 9-1 resume nuestro modelo actual de la relación entre genotipo y fenotipo.

¿Cómo hemos llegado a este punto? Ha sido como resultado del intento de responder a dos preguntas:

1. ¿Cuál es la estructura física del material genético?
2. ¿Cómo ejerce su acción el material genético? (O, con más detalle, ¿cómo funciona su estructura?).

En el capítulo anterior, se describió la demostración de que el DNA es el material genético y se detalló la elucidación de la estructura del DNA. A partir de ahora, en los Capítulos 9 y 10, examinaremos cómo funcionan los genes.

CUADRO 9-1. Modelo de la relación entre genotipo y fenotipo

1. Los rasgos característicos de un organismo están determinados por el fenotipo de sus partes componentes, las cuales están determinadas a su vez por el fenotipo de sus células.
2. El fenotipo de una célula está determinado por su química interna, la cual está controlada por las enzimas que catalizan sus reacciones metabólicas.
3. La función de la enzima depende de su estructura tridimensional, que a su vez depende de la secuencia lineal concreta de aminoácidos de la enzima.
4. Las enzimas de la célula, así como las proteínas estructurales, están determinadas por el genotipo de la célula.
5. Los genes dictan la secuencia lineal de aminoácidos de los polipéptidos, determinando así, en última instancia, los fenotipos.

Cómo funcionan los genes

Las primeras pistas sobre la naturaleza de la función primaria de los genes proceden de estudios realizados en la especie humana. A comienzos del siglo XX, Archibald Garrod, un médico, se dio cuenta de que varias enfermedades hereditarias humanas se debían a mutaciones recesivas. Algunas de ellas podían relacionarse directamente con defectos metabólicos que alteraban la química básica del organismo, observación que condujo a la idea de «errores congénitos» del metabolismo. Por ejemplo, la fenilcetonuria, que está provocada por un alelo autosómico recesivo, se debe a la incapacidad para convertir la fenilalalina en tirosina. Como consecuencia, se acumula fenilalanina, que se convierte espontáneamente en un compuesto tóxico, el ácido fenilpirúvico. Otro ejemplo es el albinismo que está causado por la incapacidad de convertir la tirosina en melanina. En cualquier caso, las observaciones de Garrod alertaron sobre el control que ejercen los genes sobre el metabolismo.

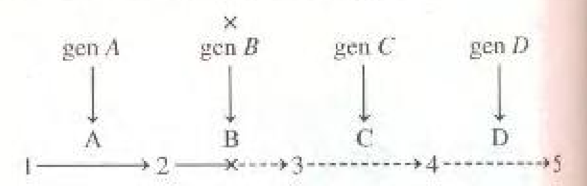
Hipótesis un gen-una enzima

La función real de los genes se esclareció con las investigaciones llevadas a cabo en los años 40 por George Beadle y Edward Tatum con *Neurospora*. Estos investigadores recibirían más tarde el Premio Nobel por este trabajo. Antes de describir sus experimentos concretos, demos un salto hacia delante y veamos algunos aspectos de las **rutas biosintéticas**, de acuerdo con nuestros conocimientos actuales. Hoy sabemos que las moléculas se sintetizan en una serie de pasos, catalizados cada uno de ellos por una enzima. Por ejemplo, una ruta biosintética puede tener cuatro pasos, siendo 1 el compuesto de partida y 5 el producto final.

$$1 \xrightarrow{A} 2 \xrightarrow{B} 3 \xrightarrow{C} 4 \xrightarrow{D} 5$$

Cada paso está catalizado por una enzima: A, B, C o D. Cada enzima, a su vez, viene especificada por un gen concreto. Podemos decir que el gen *A* especifica la enzima A, el gen *B* la enzima B, etc. Por lo tanto, si inactiváramos el gen responsable de una enzima, eliminaríamos uno de los pasos y la ruta se interrumpiría.

En el esquema siguiente, la enzima B ha sido eliminada como consecuencia de una mutación en el gen *B*:



Ahora, la célula no puede llevar a cabo la reacción que convierte el compuesto 2 en el compuesto 3. La ruta está bloqueada en el compuesto 2 y no puede seguir adelante. Pero, ¿qué pasa si añadimos diferentes compuestos intermediarios? Suponga que, por ejemplo, alimentamos la célula con el compuesto 3 o el 4. ¿Podría la célula sintetizar el producto final (5)? La respuesta es sí tanto con el compuesto 3 como con el 4, ya que los pasos siguientes no están bloqueados. ¿Y si añadimos más cantidad del compuesto 1? En este caso la respuesta es no, ya que la adición del compuesto 1 no permitirá la síntesis del producto 5, porque uno de los pasos siguientes está bloqueado.

Comprobemos nuestro grado de comprensión del concepto de ruta biosintética con un problema modelo que sirva para ilustrarlo:

Supongamos que hemos aislado cinco mutantes, del 1 al 5, que no pueden sintetizar el compuesto G necesario para crecer. Conocemos los cinco compuestos, del A al E, que se requieren en la ruta biosintética, pero no el orden en el que son sintetizados por las células silvestres. Hemos comprobado la capacidad de cada compuesto para permitir el crecimiento de cada mutante con los resultados siguientes (el signo «+» significa crecimiento y el signo «—» no crecimiento):

		Compuesto comprobado					
		A	B	C	D	E	G
Mutante	1	–	–	–	+	–	+
	2	–	+	–	+	–	+
	3	–	–	–	–	–	+
	4	–	+	+	+	–	+
	5	+	+	+	+	–	+

1. ¿Cuál es el orden de los distintos compuestos en la ruta metabólica? ¿Cómo abordamos este tipo de problemas? En primer lugar, busquemos la regla subyacente y, a continuación, dibujemos un diagrama. El punto principal es que una mutación bloquea una ruta biosintética porque suprime una enzima necesaria en la ruta. Por tanto, el mutante correspondiente carece de uno de los compuestos necesarios en la ruta, de forma que no puede sintetizar ninguno de los compuestos posteriores al punto de bloqueo. Si añadimos un compuesto que se sintetiza normalmente antes del punto del bloqueo, el mutante seguirá siendo incapaz de sintetizar el resto de los compuestos de la ruta. Sin embargo, si añadimos compuestos posteriores al punto de bloqueo, el mutante crecerá, ya que tiene las enzimas necesarias para sintetizar la sustancia G a partir de esos compuestos. Así, en nuestro análisis de los mutantes bloqueados en diferentes pasos de la ruta, los compuestos más tardíos de la ruta permitirán el crecimiento de más mutantes, mientras que los compuestos más tempranos permitirán el crecimiento de menos mutantes. La tabla muestra que el compuesto que permite el crecimiento de menos mutantes es el E, con el que no crece ningún mutante, seguido del A (un mutante), a continuación C, B, D y finalmente G, que es el producto final. Ahora ya podemos construir nuestro diagrama:

$$E \longrightarrow A \longrightarrow C \longrightarrow B \longrightarrow D \longrightarrow G$$

2. ¿En qué paso de la ruta está bloqueado cada mutante? Un mutante bloqueado entre E y A no puede crecer cuando se le aporta exógenamente E, pero sí cuando se le aporta cualquiera de los otros compuestos. Al analizar la tabla vemos que el mutante 5 es el que está bloqueado en el paso de E a A. Vemos también que el mutante 4 no puede crecer ni con E ni con A, por lo que debe estar bloqueado en el paso de A a C. Aplicando la misma lógica, se deduce el orden 5-4-2-1-3, que podemos incluir en el diagrama anterior de la forma siguiente:

$$E \xrightarrow{5} A \xrightarrow{4} C \xrightarrow{2} B \xrightarrow{1} D \xrightarrow{3} G$$

Ahora podemos comprender cómo Beadle y Tatum llevaron a cabo por primera vez este tipo de experimentos, estudiando una ruta concreta de *Neurospora*.

Experimentos de Beadle y Tatum

Beadle y Tatum estudiaron mutantes de *Neurospora*. Primero irradiaron conidios de *Neurospora* para producir mutaciones y, a continuación, buscaron fenotipos mutantes interesantes. Así detectaron numerosos **auxótrofos**: estirpes que no pueden crecer en un medio mínimo, a menos que éste sea enriquecido con nutrientes concretos. En todos los casos, las mutaciones que provocaban las auxotrofías se heredaban como mutaciones en un único gen, ya que todas producían una segregación 1:1 cuando se cruzaban con la estirpe silvestre (tenga en cuenta que *Neurospora* es haploide). La Figura 9-1 muestra el procedimiento empleado por Beadle y Tatum.

Una serie de mutantes requerían la adición de arginina al medio mínimo para crecer. Estas estirpes fueron el objeto de muchos de los trabajos posteriores de Beadle y Tatum. En primer lugar, descubrieron que, aunque el mismo suplemento (arginina) permitía el crecimiento de todos los mutantes, las mutaciones se localizaban en tres lugares diferentes situados en cromosomas distintos. A estos tres loci los llamaremos genes *arg-1*, *arg-2* y *arg-3*. Beadle y Tatum observaron que los auxótrofos de cada uno de los tres loci diferían en su respuesta a los compuestos químicos ornitina y citrulina, que están relacionados con la arginina (Fig. 9-2). Los mutantes *arg-1* eran capaces de crecer si se les añadía ornitina o arginina al medio mínimo. Los mutantes *arg-2* crecían cuando se les añadía arginina o citrulina, pero no cuando se añadía ornitina. Los mutantes *arg-3* crecían sólo cuando se añadía arginina. Esto se aprecia más fácilmente en el Cuadro 9-2.

Cuando Beadle y Tatum realizaron estos experimentos ya se sabía que compuestos relacionados químicamente se convertían unos en otros por la acción de las enzimas celulares. Basándose en las propiedades de los mutantes *arg*, Beadle, Tatum y sus colaboradores propusieron un modelo bioquímico para las conversiones relacionadas con la arginina en *Neurospora*:

$$\text{precursor} \xrightarrow{\text{enzima X}} \text{ornitina} \xrightarrow{\text{enzima Y}} \text{citrulina} \xrightarrow{\text{enzima Z}} \text{arginina}$$

Observe cómo este modelo explica fácilmente las tres clases de mutantes del Cuadro 9-2. Los mutantes *arg-1* tienen una enzima X defectuosa, de manera que son incapaces de convertir el precursor en ornitina como primer paso de la síntesis de arginina. Sin embargo, estos mutantes pueden sintetizar arginina si se les suministra ornitina o citrulina, ya que poseen enzimas Y y Z funcionales. Los mutantes *arg-2* carecen de la enzima Y y los mutantes *arg-3* de la enzima Z. Así pues, podemos suponer que una mutación en un gen determinado interfiere con la síntesis de una única enzima. La enzima defectuosa origina entonces un bloqueo de alguna ruta biosintética. Éste puede ser burlado, si suministramos a las células cualquier compuesto que normalmente aparece en la ruta después del paso bloqueado.

CUADRO 9-2. Crecimiento de los mutantes *arg* en respuesta a distintos suplementos

Mutante	SUPLEMENTO Ornitina	Citrulina	Arginina
arg-1	+	+	+
arg-2	–	+	+
arg-3	–	–	+

Nota: un signo «+» indica crecimiento y un signo «–» no crecimiento.

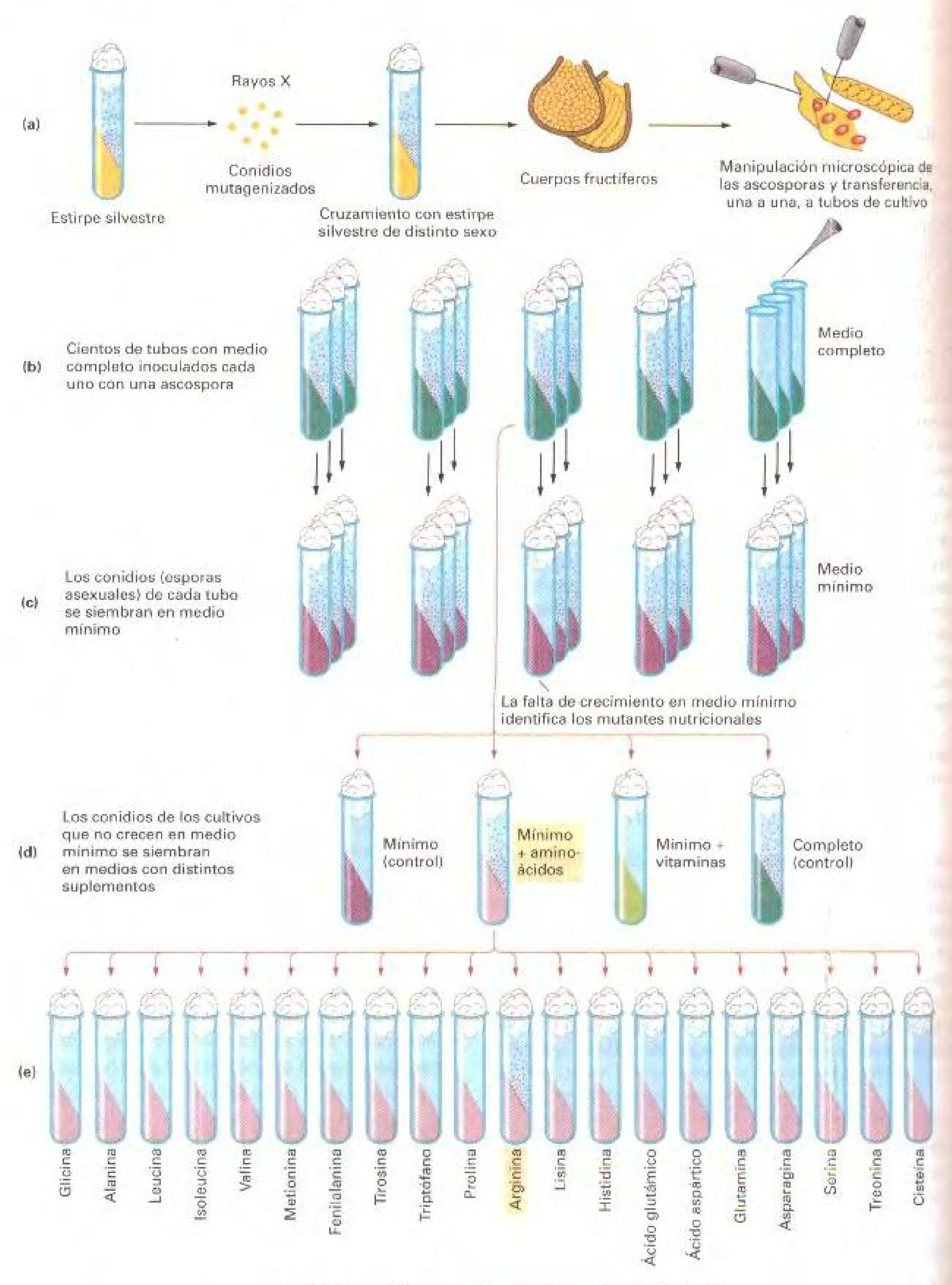


Figura 9-1. El procedimiento empleado por Beadle y Tatum. Véase el Capítulo 6 para revisar el ciclo de vida y la genética de *Neurospora*. (Según Peter J. Russell, *Genetics*, 2.ª ed. Scott, Foresman.)

Ornitina	Citrulina	Arginina
	CH_2	CH_2
	|	|
	C=O	C=NH
	|	|
NH_2	NH	NH
|	|	|
$(CH_2)_3$	$(CH_2)_3$	$(CH_2)_3$
|	|	|
$CHNH_2$	$CHNH_2$	$CHNH_2$
|	|	|
COOH	COOH	COOH

Figura 9-2. Estructura química de la arginina y de los compuestos relacionados citrulina y ornitina. Beadle y Tatum encontraron es sus experimentos varios mutantes auxótrofos *arg* que crecían cuando el medio era enriquecido con citrulina u ornitina como alternativas a la arginina.

Ahora podemos hacer un esquema más completo del modelo bioquímico:

$$\begin{array}{ccccccc} & & arg\text{-}1^+ & & arg\text{-}2^+ & & arg\text{-}3^+ \\ & & \downarrow & & \downarrow & & \downarrow \\ \text{precursor} & \xrightarrow{\text{enzima X}} & \text{ornitina} & \xrightarrow{\text{enzima Y}} & \text{citrulina} & \xrightarrow{\text{enzima Z}} & \text{arginina} \end{array}$$

Dése cuenta que todo el modelo fue inferido a partir de las propiedades de las distintas clases de mutantes detectadas mediante el análisis genético. Más tarde se demostraría, mediante pruebas bioquímicas, la existencia de la ruta biosintética y la presencia de enzimas defectuosas.

Este modelo, que ha llegado a conocerse como **hipótesis un gen-una enzima**, supuso la primera incursión excitante en el misterio de las funciones de los genes: los genes eran responsables, de algún modo, de la actividad de las enzimas y, aparentemente, cada gen controlaba una enzima concreta. Otros investigadores obtuvieron resultados similares con otras rutas biosintéticas, y la hipótesis ganó pronto la aceptación general. Posteriormente, esta hipótesis fue retocada, como veremos más adelante en este capítulo. No obstante, la hipótesis un gen-una enzima llegó a ser uno de los grandes conceptos unificadores de la Biología, ya que constituyó un puente que unió los conceptos y las técnicas en la investigación de la Genética y de la Bioquímica.

COROLARIO

Los genes controlan las reacciones bioquímicas a través de la producción de *enzimas*.

Conviene hacer una pausa para valorar el significado de este descubrimiento. Resumamos los aspectos establecidos hasta ahora:

1. Las transformaciones bioquímicas *in vivo* (en la célula viva) consisten en una serie de reacciones discretas sucesivas.
2. Cada reacción es catalizada específicamente por una única enzima.
3. Cada enzima está determinada por un único gen.

Relación gen-proteína

La hipótesis un gen-una enzima supuso un paso decisivo para nuestra compresión de la función de los genes, pero *¿cómo* controlan los genes el funcionamiento de las enzimas? Prácticamente todas las enzimas son proteínas, así que debemos repasar los aspectos básicos de la estructura de las proteínas antes de dar el paso siguiente en el estudio de la función génica.

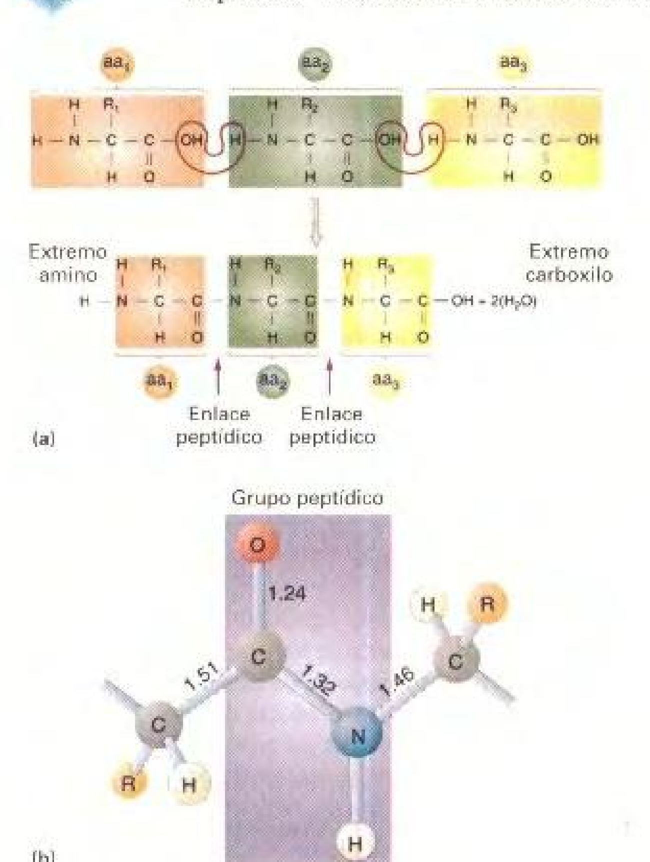
La estructura de las proteínas

En términos sencillos, una **proteína** es una macromolécula compuesta de **aminoácidos** unidos unos a otros en una cadena lineal. La fórmula general de un aminoácido es $H_2N\text{-}CHR\text{-}COOH$, en la que el grupo R (reactivo) puede ser desde un átomo de hidrógeno (caso del aminoácido glicina) hasta un anillo complejo (caso del aminoácido triptófano). Existen 20 aminoácidos esenciales en los seres vivos (Cuadro 9-3), cada uno con un grupo R diferente. En las proteínas, los aminoácidos están unidos entre sí mediante un tipo de enlace covalente llamado enlace peptídico. Un **enlace peptídico** se origina mediante una reacción de condensación que conlleva la pérdida de una molécula de agua (Fig. 9-3).

Varios aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos forman una molécula llamada **polipéptido**. Las proteínas en-

CUADRO 9-3. Los 20 aminoácidos comunes a todos los seres vivos

	ABREVIATURA			ABREVIATURA	
Aminoácido	3 letras	1 letra	Aminoácido	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A	Leucina	Leu	L
Arginina	Arg	R	Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N	Metionina	Met	M
Ácido aspártico	Asp	D	Fenilalanina	Phe	F
Cisteína	Cys	C	Prolina	Pro	P
Ácido glutámico	Glu	E	Serina	Ser	S
Glutamina	Gln	Q	Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G	Triptófano	Trp	W
Histidina	His	H	Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I	Valina	Val	V



contradas en los seres vivos son polipéptidos largos. Por ejemplo, la cadena α de la hemoglobina humana está formada por 141 aminoácidos, mientras que algunas proteínas lo están por más de 1000 aminoácidos.

Las propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos (grupos R) son responsables de la estructura y función de las proteínas. Estas cadenas laterales difieren en muchas propiedades químicas. Una propiedad fundamental es el carácter hidrofóbico de cada aminoácido. Los aminoácidos hidrofóbicos tienden a evitar el contacto con el agua y, a menudo, se orientan hacia la parte interna de la proteína, mientras que los aminoácidos cargados o que son capaces de establecer puentes de hidrógeno con el agua son excluidos del interior de la proteína y quedan en la parte exterior o superficie de la proteína.

Las proteínas poseen una estructura compleja en la que se han distinguido tradicionalmente cuatro niveles. La secuencia lineal de los aminoácidos de una cadena polipeptídica se denomina **estructura primaria** de la proteína. La Figura 9-4 muestra ...

Figura 9-3. El enlace peptídico. (a) Un polipéptido se forma por eliminación de agua entre aminoácidos para formar enlaces peptídicos. Cada aa representa un aminoácido. R_1, R_2 y R_3 representan grupos R (cadenas laterales) de los distintos aminoácidos. R puede ser desde un átomo de hidrógeno (como en la glicina) hasta un anillo complejo (como en el triptófano). (b) El grupo peptídico es una unidad plana rígida con grupos R proyectándose hacia fuera del esqueleto de C—N. Se indican las distancias de enlace típicas (en Angstroms). (Parte b tomada de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.)

(a) Met-Glu-Arg-Tyr-Glu-Ser-Leu-Phe-Ala-Gln-Leu-Lys-Glu-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Phe-Val-Pro-Phe-Val-Thr-Leu-Gly-Asp-Pro-Gly-...
Glu-Gln-Ser-Leu-Lys-Ile-Ile-Asp-Thr-Leu-Ile-Glu-Ala-Gly-Ala-Asp-Ala-Leu-Glu-Leu-Gly-Ile-Pro-Phe-Ser-Asp-Pro-Leu-Ala-...
Gly-Pro-Thr-Ile-Gln-Asn-Ala-Thr-Leu-Arg-Ala-Phe-Ala-Ala-Gly-Val-Thr-Pro-Ala-Gln-Cys-Phe-Glu-Met-Leu-Ala-Leu-Ile-Arg-...
Lys-His-Pro-Thr-Ile-Pro-Ile-Gly-Leu-Leu-Met-Tyr-Ala-Asn-Leu-Val-Phe-Asn-Lys-Gly-Ile-Asp-Glu-Phe-Tyr-Ala-Gln-Cys-Glu-...
Val-Gly-Val-Asp-Ser-Val-Leu-Val-Ala-Asp-Val-Pro-Val-Gln-Glu-Ser-Ala-Pro-Phe-Arg-Gln-Ala-Ala-Leu-Arg-His-Asn-Val-Ala-...
Ile-Phe-Ile-Cys-Pro-Pro-Asn-Ala-Asp-Asp-Asp-Leu-Leu-Arg-Gln-Ile-Ala-Ser-Tyr-Gly-Arg-Gly-Tyr-Thr-Tyr-Leu-Leu-Ser-Arg-...
Gly-Val-Thr-Gly-Ala-Glu-Asn-Arg-Ala-Ala-Leu-Pro-Leu-Asn-His-Leu-Val-Ala-Lys-Leu-Lys-Glu-Tyr-Asn-Ala-Ala-Pro-Pro-Leu-...
Gly-Phe-Gly-Ile-Ser-Ala-Pro-Asp-Gln-Val-Lys-Ala-Ala-Ile-Asp-Ala-Gly-Ala-Ala-Gly-Ala-Ile-Ser-Gly-Ser-Ala-Ile-Val-Lys-...
Ile-Glu-Gln-His-Asn-Ile-Glu-Pro-Glu-Lys-Met-Leu-Ala-Ala-Leu-Lys-Val-Phe-Val-Gln-Pro-Met-Lys-Ala-Ala-Thr-Arg-Ser (268)

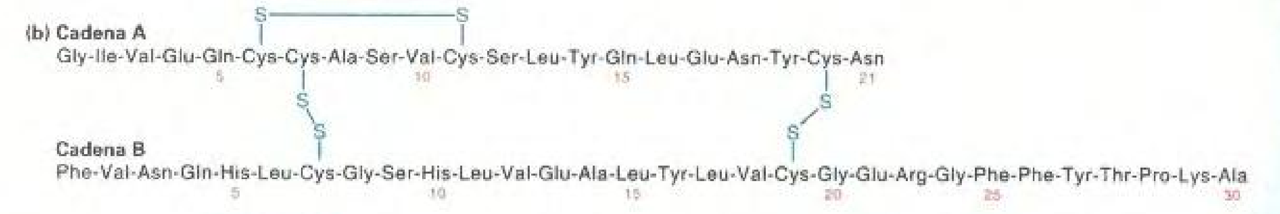


Figura 9-4. Secuencia primaria de dos proteínas. (a) La proteína A de la sintetasa de triptófano de *E. coli* de 268 aminoácidos. (b) La insulina bovina. Observe que el aminoácido cisteína puede formar «puentes disulfuro» característicos, debido a que contiene azufre.

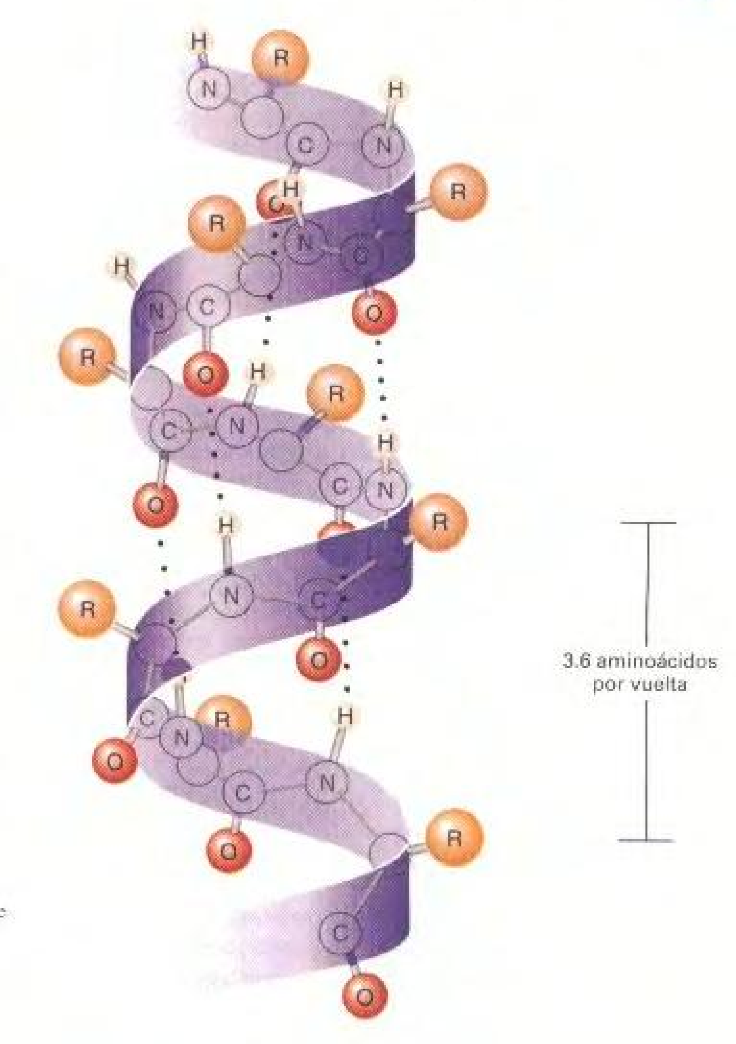


Figura 9-5. La hélice α es un elemento frecuente de la estructura secundaria de las proteínas. Cada R representa una cadena lateral específica de un aminoácido. Los puntos negros representan puentes de hidrógeno débiles que unen el grupo CO del aminoácido n al grupo NH del aminoácido $n + 4$, estabilizando de ese modo la forma helicoidal. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)

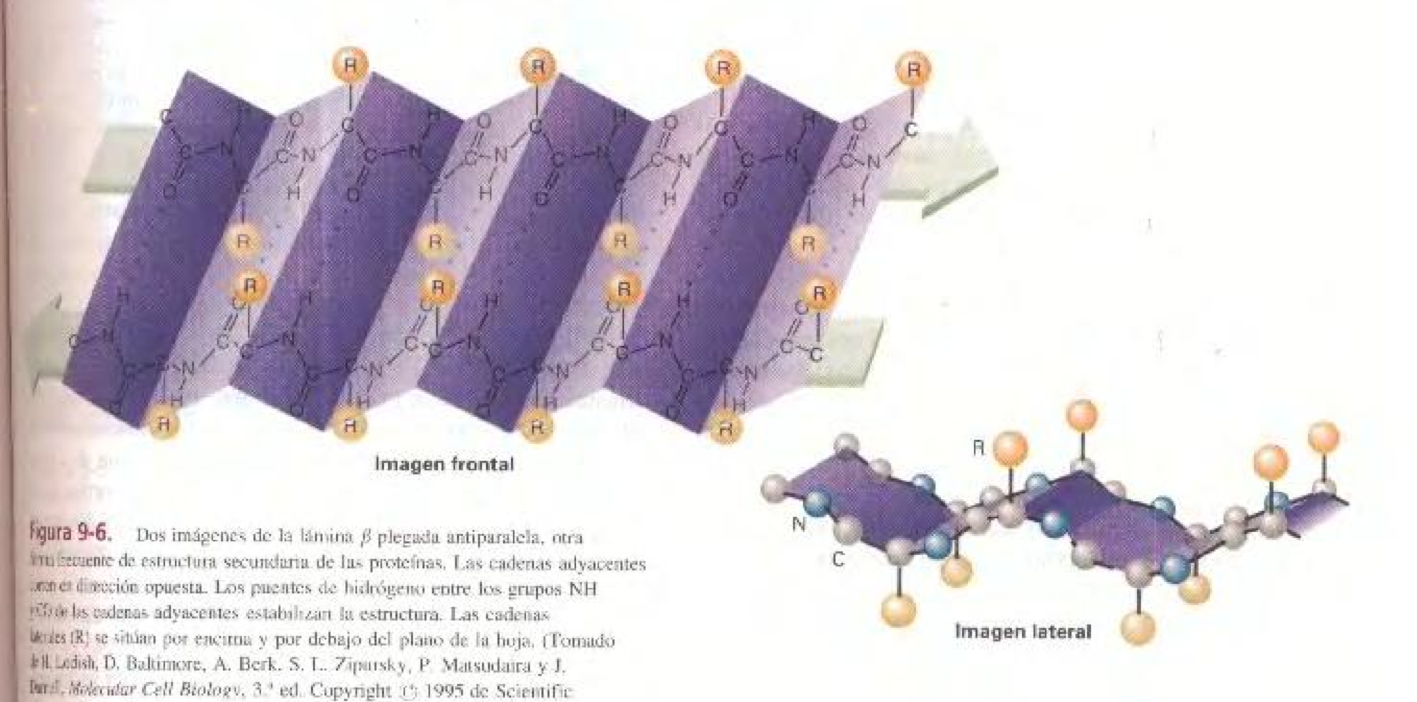


Figura 9-6. Dos imágenes de la lámina β plegada antiparalela, otra forma frecuente de estructura secundaria de las proteínas. Las cadenas adyacentes corren en dirección opuesta. Los puentes de hidrógeno entre los grupos NH y CO de las cadenas adyacentes estabilizan la estructura. Las cadenas laterales (R) se sitúan por encima y por debajo del plano de la hoja. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)

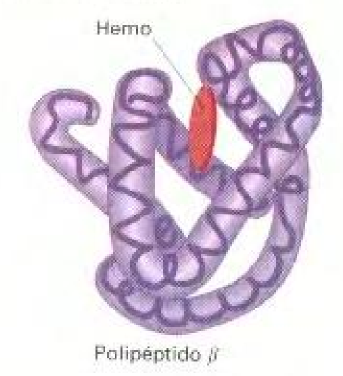
(a) Estructura primaria

Extremo carboxilo — Extremo amino

(b) Estructura secundaria

Puentes de hidrógeno entre aminoácidos localizados en distintas posiciones de la cadena polipeptídica

(c) Estructura terciaria



(d) Estructura cuaternaria

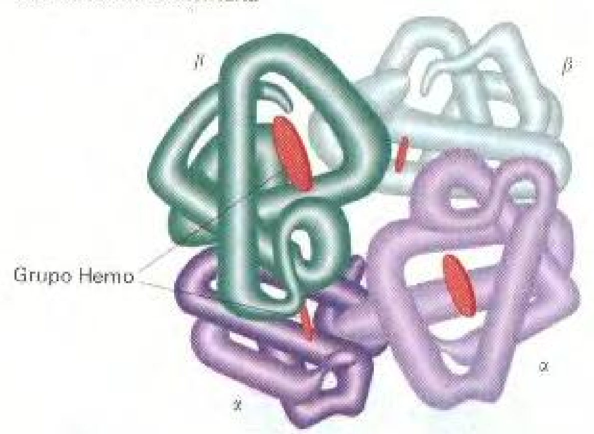


Figura 9-7. Diferentes niveles de la estructura de la proteínas. (a) Estructura primaria. (b) Estructura secundaria. El polipéptido de la parte (a) adquiere la estructura de hélice α por acción de los puentes de hidrógeno. (c) Estructura terciaria: estructura tridimensional de la mioglobina. (d) Estructura cuaternaria: disposición de las dos subunidades α y las dos subunidades β para formar la estructura cuaternaria de la hemoglobina.

estructuras primarias de la sintetasa del triptófano (una enzima) y de la insulina de vaca (una proteína hormonal).

La **estructura secundaria** de la proteína se refiere a las interrelaciones de los aminoácidos que están próximos en la secuencia lineal. A menudo, esta disposición espacial es consecuencia de que los polipéptidos pueden curvarse formando estructuras repetidas regularmente, originadas por puentes de hidrógeno entre los grupos CO y NH de aminoácidos diferentes. Dos de estas estructuras periódicas elementales son la hélice α (Fig. 9-5) y la lámina β plegada (Fig. 9-6).

Las proteínas tienen también una arquitectura tridimensional denominada **estructura terciaria**, que se genera por la formación de enlaces electrostáticos, de hidrógeno y de Van der Waals entre los grupos R de varios aminoácidos, que hacen que la cadena de la proteína se pliegue sobre sí misma. En muchas ocasiones, los aminoácidos que se encuentran alejados en la secuencia lineal de la proteína aparecen próximos en la estructura terciaria. A menudo, dos o más estructuras plegadas se asocian para formar una **estructura cuaternaria**. Esta estructura tiene carácter **multimérico**, porque está formada por varias cadenas polipeptídicas separadas o monómeros.

En la Figura 9-7 se representan los cuatro niveles de la estructura de una proteína. En la Figura 9-7*c* podemos observar la estructura terciaria de la mioglobina. Fíjese como la hélice α está plegada sobre sí misma para generar la forma tridimensional de la proteína. La Figura 9-7*d* muestra la combinación de cuatro subunidades (dos cadenas α y dos cadenas β) para formar la estructura cuaternaria de la hemoglobina. La Figura 9-8 muestra la estructura de la mioglobina con más detalle. La combinación de las subunidades para formar la enzima multimérica puede verse directamente, en algunos casos, con el microscopio electrónico (Fig. 9-9).

Muchas proteínas tienen una estructura compacta y se denominan **proteínas globulares**. Las enzimas y los anticuerpos son

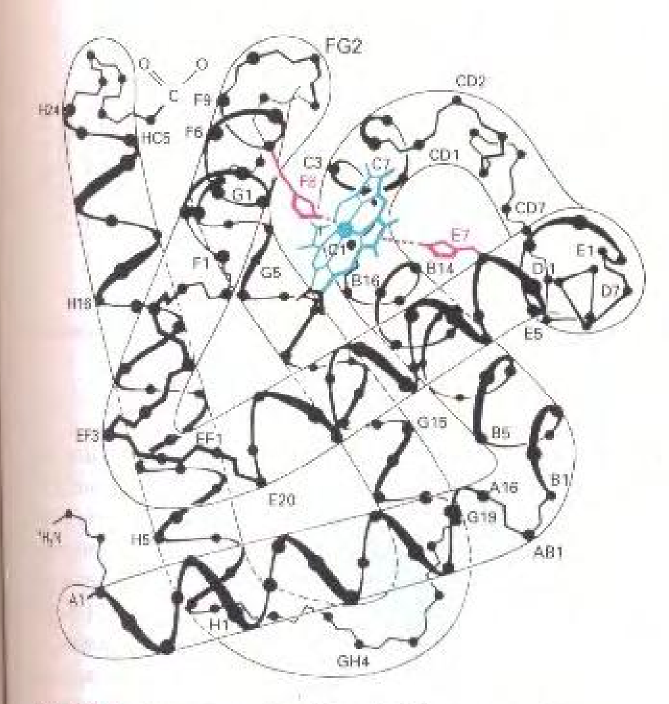


Figura 9-8. Estructura terciaria de la mioglobina, una proteína que almacena oxígeno. Cada punto representa un aminoácido. El grupo hemo, un cofactor que facilita la unión al oxígeno aparece en azul. (Tomado de L. Stryer, *Biochemistry*. 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer. Basado en R. E. Dickerson, *The Proteins*, 2.ª ed., vol. 2. Editado por H. Neurath. Copyright © 1964 de Academic Press).

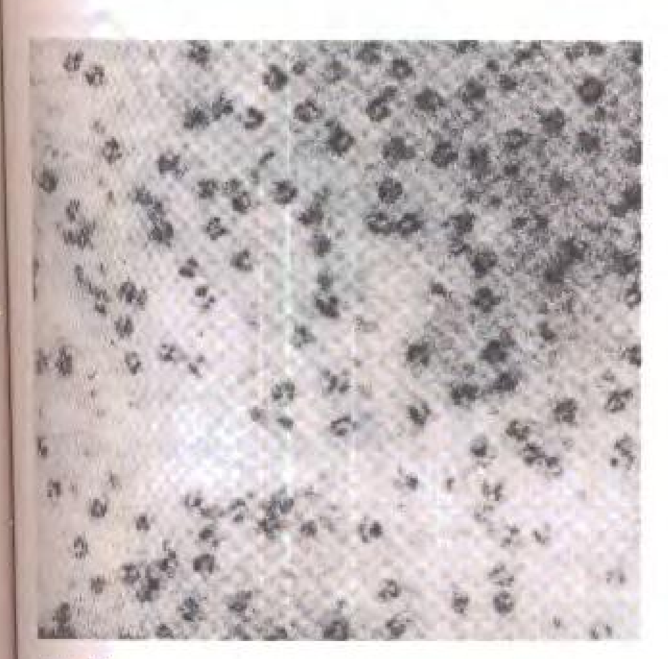


Figura 9-9. Microfotografía electrónica de la enzima transcarbamilasa aspartato. Cada «mancha» pequeña es una molécula de la enzima. Observe la estructura cuaternaria: la enzima está compuesta de subunidades. (Fotografía cortesía de Jack. D. Griffith.)

entre las proteínas globulares más importantes. Otras proteínas no compactas, llamadas **proteínas fibrilares**, son componentes fundamentales de estructuras como el pelo y el músculo.

COROLARIO

La secuencia lineal de una proteína se pliega en una estructura tridimensional única. Este plegamiento genera sitios específicos a los que se unen los sustratos y en los que tiene lugar la reacción catalítica. La conformación tridimensional de una proteína, crucial para su función, está determinada sólo por su estructura primaria (secuencia lineal de aminoácidos). Por tanto, los genes pueden controlar la función de las enzimas mediante la determinación de la estructura primaria de las proteínas.

Motivos de las proteínas

Con frecuencia, varios elementos de la estructura secundaria se combinan para producir un patrón, o motivo, que se encuentra en numerosas proteínas. En ocasiones, podemos reconocer los motivos por su patrón de secuencia de aminoácidos, y en otros casos, observando la estructura tridimensional. La Figura 9-10 muestra dos ejemplos. El motivo hélice-bucle-hélice se encuentra en proteínas que unen calcio, y una variante del mismo aparece en proteínas reguladoras que se unen al DNA. El motivo de unión a zinc, que también se encuentra en proteínas que se unen al DNA, se denomina «dedo de zinc», debido a que los aminoácidos forman unas protuberancias en la proteína similares a un dedo.

Determinación de las secuencias de proteínas

Cuando purificamos una proteína determinada, podemos determinar la proporción concreta de los distintos aminoácidos que la forman. Pero la proteína no resulta de la alineación al azar de cantidades fijas de distintos aminoácidos, por el contrario, cada proteína tiene una secuencia única y característica. En el caso de un polipéptido pequeño, se puede determinar la secuencia de aminoácidos, desgajando un aminoácido de uno de sus extremos e identificándolo. Este proceso se puede repetir varias veces hasta conseguir la secuencia completa, sin embargo, no es fácil «secuenciar» polipéptidos largos de esta forma.

Frederick Sanger desarrolló un método brillante para descifrar la secuencia de polipéptidos largos. Existen diferentes **enzimas proteolíticas** (enzimas que rompen enlaces peptídicos entre aminoácidos específicos de las proteínas). Estas enzimas pueden romper una proteína en cierto número de fragmentos pequeños, que podemos purificar, aprovechando su velocidad de migración en un papel de cromatografía con un solvente determinado. Debido a que la velocidad de migración de los distintos fragmentos varía mucho con diferentes solventes, podemos utilizar una **cromatografía bidimensional** para mejorar la resolución de los fragmentos (Fig. 9-11). Esta técnica consiste en separar primero los fragmentos con un solvente, girar luego el papel 90° y utilizar entonces un solvente distinto. Al teñir el papel, los polipéptidos aparecen como manchas, que se distribuyen según un patrón característico denominado **huella** de la proteína. A continuación, podemos cortar cada una de las manchas y, con una solución adecuada, extraer el fragmento. Puesto que las manchas contienen fragmentos pequeños, podemos determinar su secuencia con cierta facilidad.

Podemos repetir el mismo experimento con diferentes enzimas proteolíticas para que corten en puntos distintos de la pro-

(a) Motivo hélice-bucle-hélice

N
Hélice
Bucle
Ca^{2+}
Hélice
—Asp—Asp—Asp— - -Thr- -Glu—
Hélice
Bucle
Hélice

(b) Motivo dedo de cinc

Cys
His
Zn^{2+}
Cys
His
- -Cys- -Cys- - - - - - - - - - - - - - - - -His- - -His-

(c) Complejo DNA-dedos de cinc

5′
3′
COOH
Dedo 5
Dedo 3
Dedo 4
Dedo 2
Dedo 1
3′ 5′

Figura 9-10. Motivos de la estructura secundaria. (a) El motivo hélice-bucle-hélice es una característica de muchas proteínas que unen calcio, como se muestra aquí. (b) El motivo dedo de cinc está presente en muchas proteínas que se unen a los ácidos nucleicos. Un ion Zn^{2+} es mantenido, entre una pareja de cadenas beta (en verde) y una hélice alfa (en azul), por una pareja de cisteínas y otra de histidinas. (c) Modelo del complejo formado por el DNA y una proteína con cinco dedos de cinc. (Según H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)

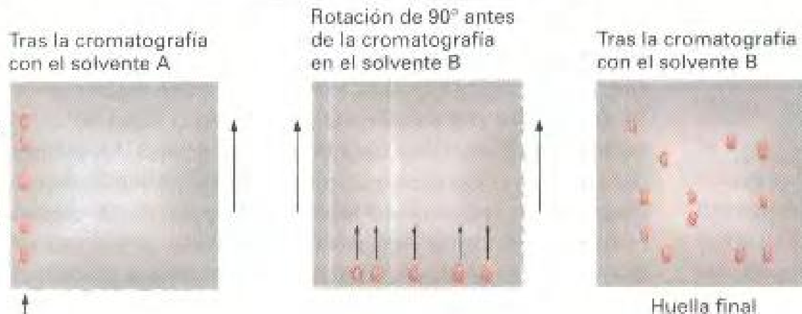


Figura 9-11. Huella cromatográfica bidimensional de una mezcla de fragmentos polipeptídicos. Una proteína se digiere con una enzima proteolítica en fragmentos de sólo unos pocos aminoácidos. La mezcla de fragmentos se deposita sobre un papel de cromatografía, que se sumerge en el solvente A. Conforme el solvente A asciende por el papel, algunos de los fragmentos se separan. Entonces, se gira el papel 90° y se obtiene una nueva separación de fragmentos con el solvente B.



Figura 9-12. Alineación de fragmentos polipeptídicos para reconstruir una secuencia completa de aminoácidos. Se utilizan diferentes enzimas proteolíticas para digerir la misma proteína y generar así distintas huellas cromatográficas. La secuencia de aminoácidos de cada mancha se determina con cierta facilidad y, dado el solapamiento entre la secuencia de aminoácidos de distintas manchas de las diferentes huellas, puede obtenerse la secuencia completa de aminoácidos de la proteína original. Empleando este procedimiento, Sanger tardó unos seis años en determinar la secuencia de la molécula de insulina, una proteína relativamente pequeña.

teína y así obtener otras series de fragmentos. Los fragmentos de los diferentes tratamientos solaparán unos con otros y el problema de obtener la secuencia completa se convierte ahora en el de superponer las secuencias de los fragmentos pequeños, casi como resolver un rompecabezas complicado o un crucigrama (Fig. 9-12).

Con esta técnica, Sanger confirmó que la secuencia de aminoácidos (así como la cantidad de los diversos aminoácidos) es específica para una proteína concreta. En otras palabras, la secuencia de aminoácidos es la que hace que la insulina sea la insulina.

Relación entre mutaciones génicas y proteínas alteradas

Hoy sabemos que el cambio de un solo aminoácido es suficiente para alterar la función de una proteína. Esto fue demostrado por primera vez en 1957 por Vernon Ingram, estudiando la proteína globular hemoglobina, la molécula que transporta el oxígeno en los glóbulos rojos. Como se observa en la Figura 9-7*d*, la hemoglobina está formada por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas idénticas α, cada una de ellas constituida por 141 aminoácidos, y dos cadenas idénticas β, cada una de ellas formada por 146 aminoácidos.

Ingram comparó la hemoglobina A (HbA), la hemoglobina normal de los adultos, con la hemoglobina S (HbS), la proteína de individuos homocigóticos para el alelo mutante que causa la anemia falciforme, enfermedad en la que los glóbulos rojos tienen forma de hoz (véase Fig. 4-2). Utilizando la técnica de Sanger, Ingram demostró que la huella cromatográfica de la HbS difería en una sola mancha de la huella de la HbA. Tras secuenciar los péptidos presentes en la mancha en que diferían las dos hemoglobinas, demostró que los dos fragmentos se diferenciaban en un solo aminoácido. Al parecer, de todos los aminoácidos que se sabe que forman la molécula de hemoglobina, basta el cambio de valina por ácido glutámico en un solo sitio, la posición 6 de la cadena β, para que se produzca la hemoglobina defectuosa (Fig. 9-13). Este único error en un aminoácido de una proteína acelerará la muerte de los pacientes con HbS, a menos

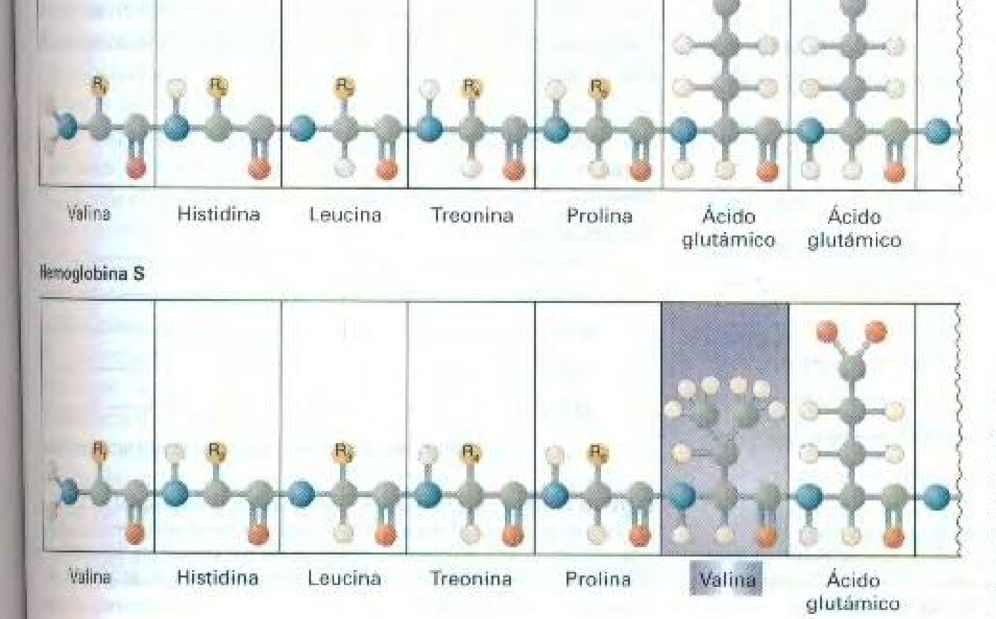


Figura 9-13. Diferencia molecular entre la anemia falciforme y el fenotipo normal. Se muestran los siete primeros aminoácidos, ya que el resto son idénticos. (Tomado de Anthony Cerami y Charles M. Peterson, «Cyanate and Sickle-Cell Disease». Copyright © 1975 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

Base errónea en el DNA
Valina en la posición 6 del polipéptido
Hemoglobina anormal
Hematíes falciformes
Destrucción rápida de las células falciformes
Coágulos celulares que bloquean la circulación sanguínea
Acumulación de hematíes en el bazo
Anemia
Fallos locales en el suministro de sangre
Actividad extra de la médula ósea
Cansancio
Dilatación del corazón
Daños musculares y articulares
Daños en el aparato gastrointestinal
Aumento de tamaño del bazo
Turricefalia
Marasmo
Reumatismo
Dolor abdominal
Lesión cardíaca
Lesión renal
Daños cerebrales
Daños en el pulmón
Insuficiencia cardíaca
Insuficiencia renal
Parálisis
Neumonía
Fibrosis del bazo

Figura 9-14. Cascada de efectos que provoca la anemia falciforme, debida a un cambio de aminoácido en la hemoglobina.

que reciban atención médica continuada. La Figura 9-14 muestra cómo esta mutación provoca las alteraciones asociadas a esta enfermedad.

Preste atención al descubrimiento realizado por Ingram. Una alteración hereditaria, genéticamente bien estudiada, pudo ser relacionada con una alteración en la secuencia de aminoácidos de una proteína. Estudios posteriores identificaron muchas otras alteraciones de la hemoglobina, y todas ellas se debían al cambio de un solo aminoácido (la Fig. 9-15 muestra unos pocos ejemplos). Podemos, pues, concluir que una mutación en un gen se corresponde con el cambio de un aminoácido en la secuencia de una proteína.

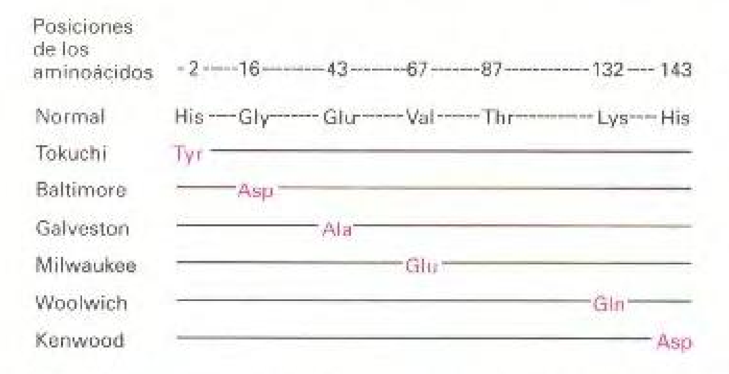


Figura 9-15. Distintos cambios de aminoácidos encontrados en la hemoglobina humana. Sólo las posiciones que se indican han cambiado. El resto de los aminoácidos son los normales. Cada cambio produce una enfermedad. (Los nombres indican la localidad en la que se descubrió el primer caso.)



Figura 9-16. Representación simplificada de la colinealidad de las mutaciones de un gen. El mapa de estas mutaciones puntuales (obtenido mediante experimentos de recombinación) se corresponde linealmente con los cambios de aminoácidos de los distintos mutantes (determinados mediante estudios de huellas cromatográficas.)

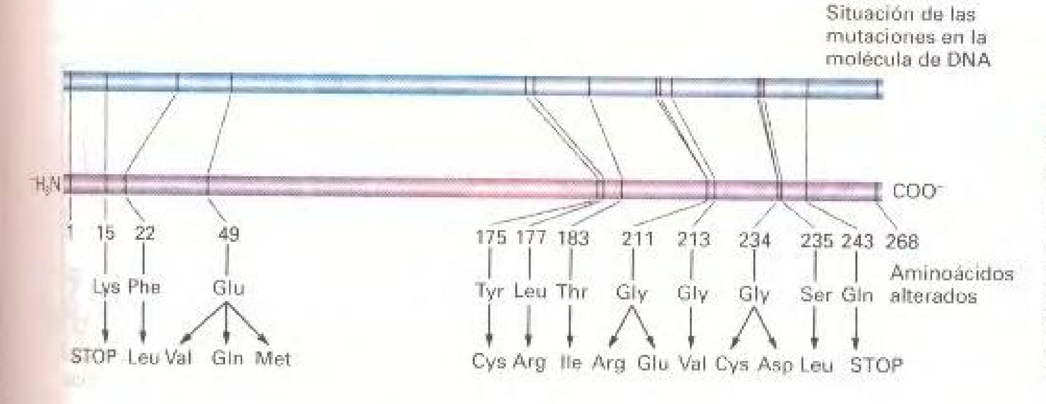


Figura 9-17. Colinealidad real obtenida con la proteína A de la sintetasa del triptófano de *E. coli*. Hay una relación lineal entre las posiciones que ocupan las mutaciones y las de los cambios de aminoácidos. (Según C. Yanofsky, «Gene Structure and Protein Structure». Copyright © 1967 de Scientific American. Reservados todos los derechos.)

COROLARIO

Los genes determinan las secuencias primarias de aminoácidos de proteínas específicas.

Colinealidad entre el gen y la proteína

La elucidación por Watson y Crick de la estructura del DNA hizo pensar que la estructura de las proteínas debería estar cifrada en la secuencia lineal de nucleótidos (veremos cómo se descifró este código genético en el próximo capítulo). Después de la demostración de Ingram de que una mutación altera un aminoácido de una proteína, se buscó una relación entre la secuencia lineal de los sitios mutados de un gen y la secuencia de aminoácidos de una proteína (puede elaborarse un mapa de mutaciones de un gen mediante análisis de recombinación de alta resolución, como se vio en el sistema *rII*, descrito en el Capítulo 7 y que será estudiado con detalle en este capítulo).

Charles Yanofsky demostró la relación existente entre genes alterados y proteínas defectuosas, estudiando la enzima sintetasa del triptófano de *E. coli*. La enzima cataliza la conversión del indol glicerol fosfato en triptófano. Dos genes, *trpA* y *trpB*, controlan esta enzima. Cada gen determina un polipéptido distinto, los polipéptidos A y B, que tras su síntesis se asocian para formar la enzima activa (una proteína multimérica). Yanofsky analizó varias mutaciones del gen *trpA* que alteraban la subunidad A de la sintetasa del triptófano. Elaboró un mapa detallado de las mutaciones y, a continuación, determinó la secuencia de aminoácidos de cada una de las correspondientes sintetasas de triptófano alteradas. Sus resultados fueron similares a los de Ingram con la hemoglobina: cada mutante tenía un polipéptido defectuoso con un cambio de un aminoácido en una posición concreta. Sin embargo, Yanofsky fue capaz de observar una correlación interesante, que Ingram no pudo ver debido a las limitaciones de su sistema. Yanofsky encontró que existe una coincidencia perfecta entre la ordenación de los sitios mutados en el mapa del gen *trpA* y la localización de los correspondientes aminoácidos alterados en la cadena polipeptídica A. Cuanto más lejos se encuentran dos mutaciones, en unidades de mapa, más aminoácidos hay entre los dos cambios correspondientes del polipéptido (Fig. 9-16). Así pues, Yanofsky demostró la **colinealidad**: la correspondencia entre las secuencias lineales del gen y del polipéptido. En la Figura 9-17 se muestran los datos completos de Yanofsky.

COROLARIO

La secuencia lineal de nucleótidos de un gen determina la secuencia lineal de aminoácidos de una proteína.

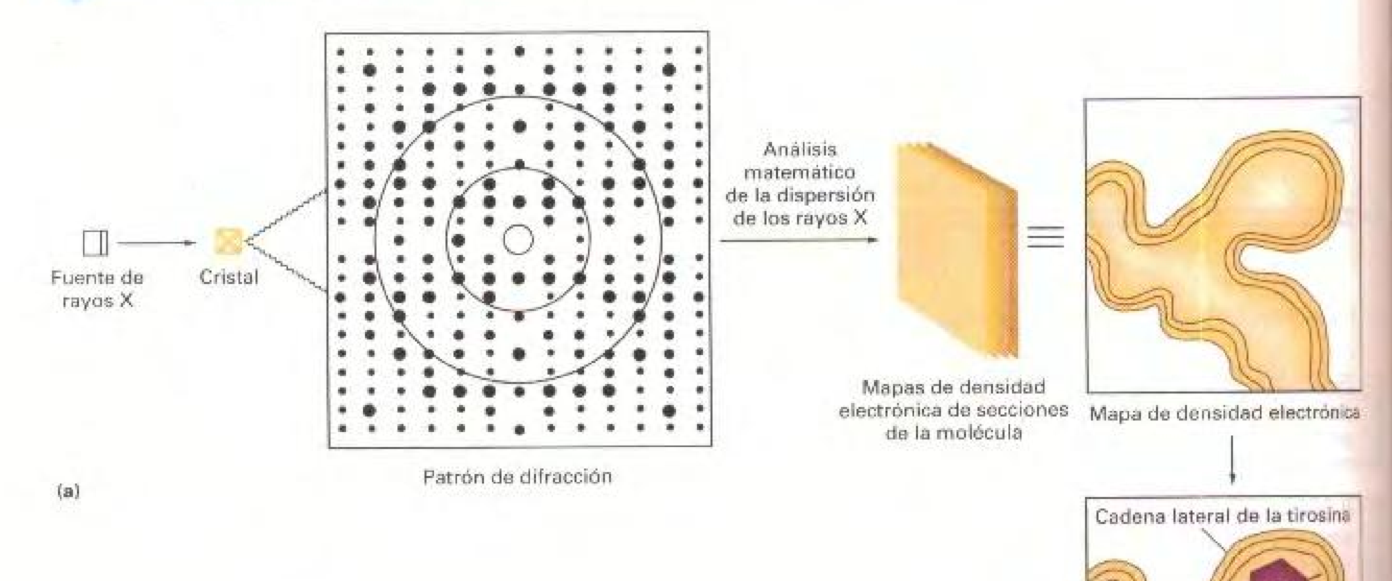
Determinación de la estructura tridimensional de las proteínas mediante rayos X

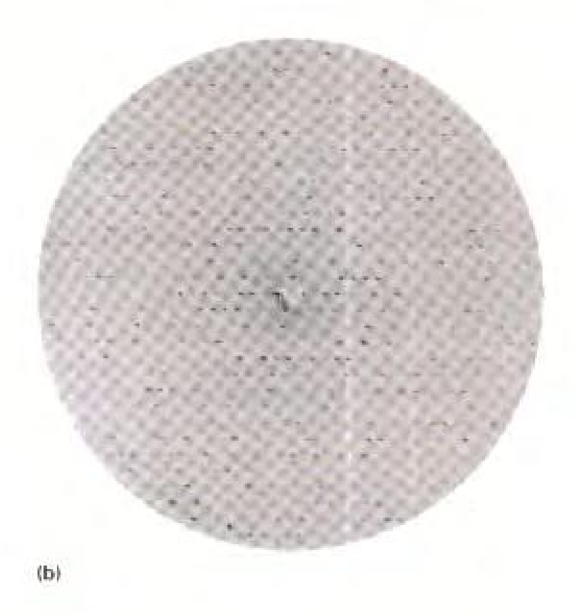
La cristalografía de rayos X es un método eficaz para determinar la estructura tridimensional de una proteína con un detalle atómico. En 1957, John Kendrew utilizó por primera vez este método en una molécula tan compleja como una proteína para determinar la estructura de la mioglobulina y, varios años después, Max Perutz consiguió desvelar las complejidades de la hemoglobina. Hoy en día, se conoce la estructura de cientos de proteínas. El primer paso de esta técnica es la obtención de cristales de la proteína a partir de una solución salina concentrada de la proteína pura. A continuación, se pasa un haz fino de rayos X a través del cristal. El patrón repetido de átomos de la proteína dispersa (o difracta) los haces de rayos X, generando un patrón de manchas en una película de rayos X, como se muestra en la Figura 9-18*a* (izquierda); véase también la Figura 9-18*b*. La posición e intensidad de cada mancha definen la densidad de electrones en diferentes partes de la proteína.

El empleo de un análisis matemático sofisticado de las manchas permite obtener un mapa de densidad de electrones (Fig. 9-18*a*, derecha), que es utilizado para generar mapas de contorno de la proteína. Finalmente, se pueden construir modelos detallados de una proteína, tal como se muestra en el modelo de llenado de espacios de la quimotripsina (Fig. 9-18*c*). Parece increíble que este modelo derive del patrón de manchas mostrado en la Figura 9-18*b*.

La función de las enzimas

¿Cómo es posible que el cambio de un solo aminoácido, como el de la hemoglobina de la anemia falciforme (Fig. 9-13), tenga un efecto tan grande sobre la función de la proteína y el fenotipo del organismo? Veamos, por ejemplo, las enzimas. Se sabe que las enzimas realizan su labor de catálisis aferrándose a su molécula




(b)

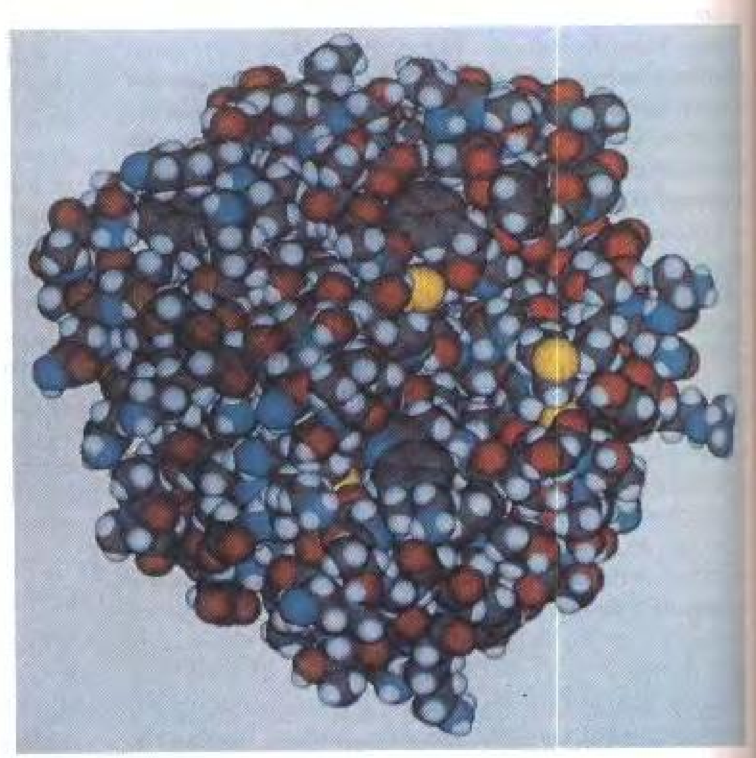

(c)

Figura 9-18. Uso de los rayos X para determinar la estructura de las enzimas. (a) Se hace pasar un haz de rayos X a través de un cristal, obteniéndose un patrón de manchas en la película de rayos X, el cual se usa para generar mapas de densidad electrónica y de contorno. (b) Patrón de difracción obtenido de la enzima quimotripsina. (c) Estructura tridimensional de la quimotripsina. Se muestran en negro los átomos de carbono, en azul los de nitrógeno, en rojo los de oxígeno, en blanco los de hidrógeno y en amarillo los de azufre. El diámetro de la enzima es de aproximadamente 45 Å (algo menos de la millonésima parte de una pulgada). La cadena lateral hidrofílica de la arginina en la posición 145 se observa claramente proyectándose hacia fuera, en el lado derecho de la molécula. Los abultamientos y surcos de la superficie de la molécula de quimotripsina son tan característicos como las montañas y cráteres de la luna y en esto se basa la hipótesis de la llave y la cerradura. (Según D. Dressler y H. Potter, *Discovering Enzymes*. Copyright © 1991 de Scientific American Library.)

(a) (b)

Figura 9-19. El centro activo de una enzima concreta, la enzima digestiva carboxipeptidasa. (a) La enzima sin su sustrato. (b) La enzima con su sustrato (en dorado) en el sitio correcto. Los tres aminoácidos críticos (en rojo) han cambiado de posición para interactuar con el sustrato. La carboxipeptidasa rompe las proteínas presentes en los alimentos. (Tomado de W. N. Lipscomb, *Proceedings of the Robert A. Welch Foundation Conferences on Chemical Research* 15, 1971, 140-141.)

sustrato, girando o doblando las moléculas para crear o romper enlaces químicos. La Figura 9-19 muestra una enzima gástrica, la carboxipeptidasa, en su estado relajado y tras unirse a su sustrato, la gliciltirosina. La molécula de sustrato encaja perfectamente en una ranura presente en la estructura de la enzima. Esta ranura se denomina **centro activo**.

La Figura 9-20 resume el concepto general. Observe que hay dos tipos básicos de reacciones catalizadas por las enzimas: la rotura de un sustrato en compuestos más simples y la síntesis de un compuesto complejo a partir de uno o varios sustratos más sencillos.

Gran parte de la estructura globular de una enzima es material no reactivo que sirve simplemente como soporte del centro activo. Por tanto, podemos esperar que cambios de aminoácidos en



Figura 9-20. Esquema del mecanismo de acción de una enzima hipotética que une dos moléculas de sustrato en una. (a) En el modelo de la llave y la cerradura, el sustrato encaja en el centro activo de la enzima. (b) En el modelo del ajuste inducido, la unión de los sustratos induce un cambio de conformación en la enzima.

muchas posiciones de la estructura tengan efectos poco notables, mientras que en aquellas posiciones de las que depende la forma precisa del centro activo, se requerirá la presencia de aminoácidos muy determinados. Existe, pues, la posibilidad de que una enzima activa no dependa de una secuencia única de aminoácidos *a lo largo de todo* el polipéptido. Esto se ha demostrado en varios polipéptidos en los que numerosas posiciones pueden ser ocupadas por varios aminoácidos distintos sin que se afecte la actividad enzimática. Pero, en otras posiciones del polipéptido sólo se permite el aminoácido presente en el silvestre para que la actividad enzimática se mantenga, por lo que, con toda probabilidad, estos aminoácidos constituyen una parte crítica de los centros activos. Algunos de estos aminoácidos críticos de la carboxipeptidasa están señalados en rojo en la Figura 9-19.

COROLARIO

La arquitectura de las proteínas es la clave de la función génica. Típicamente, una mutación génica produce un cambio de un aminoácido en la secuencia polipeptídica de una proteína. El nuevo aminoácido puede tener propiedades químicas incompatibles con la arquitectura correcta de la proteína en esa posición particular, en cuyo caso, la mutación da lugar a una proteína no funcional.

CUADRO 9-4. Ejemplos representativos de enzimopatías: enfermedades hereditarias en las que se ha demostrado la alteración (normalmente la deficiencia) de una actividad enzimática específica en humanos

Afección	Enzima con actividad deficiente*	Afección	Enzima con actividad deficiente*
Acatalasia	Catalasa	Enfermedad de Sandhoff (gangliosidosis GM_2, tipo II)	Hexosaminidasa A, B
Aciduria argininosuccínica	Argininosuccinasa	Enfermedad de Tay-Sachs	Hexosaminidasa A
Albinismo	Tirosinasa	Enfermedad de Wolman	Lipasa ácida
Alcaptonuria	Oxidasa del ácido homogentísico	Fenilcetonuria	Hidroxilasa de la fenilalanina
Angioqueratoma, difuso (enfermedad de Fabry)	Trihexosidasa de ceramida	Galactosemia	Galactosa 1-fosfato uridil transferasa
Apnea, inducida por medicamentos	Pseudocolinesterasa	Gangliosidosis, GM_1: generalizada tipo I o forma infantil	β-Galactosidasa A, B, C
Argininemia	Arginasa	Gangliosidosis, GM_1: tipo II o forma juvenil	β-Galactosidasa B, C
Ataxia, intermitente	Descarboxilasa de piruvato	Gota	Transferasa de fosforribosilo de hipoxantina-guanina Sintetasa de fosforribosil-pirofosfato (PRPP) (incremento de la actividad)
Citrulinemia	Sintetasa del ácido argininosuccínico	Granulomatosis	Oxidasa de NADPH reducido
Cistationuria	Cistationasa	Hidroxiprolinemia	Oxidasa de hidroxiprolina
Deficiencia de fosfatasa ácida	Fosfatasa ácida	Hiperlisinemia	Reductasa de la lisina-cetoglutarato
Deficiencia de aldosterona	18-Hidroxideshidrogenasa	Hipofosfatasia	Fosfatasa alcalina
Encefalomielopatía necrosante de Leigh	Carboxilasa de piruvato	Lipogranulomatosis de Farber	Ceramidasa
Enfermedad de Gaucher	Glucocerebrosidasa	Ornitinemia	Aminotransferasa del cetoácido de la ornitina
Enfermedad por inmunodeficiencia	Desaminasa de la adenosina Cinasa de la uridina-monofosfato	Pentosuria	Deshidrogenasa del xilitol (reductasa de la L-xilulosa)
Enfermedad de Krabbe	β-Galactosidasa de la galactosilceramida	Síndrome de Crigler-Najjar	Transferasa del glucuronilo
Enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce	Descarboxilasa de cetoácido	Síndrome de Ehlers-Danlos, tipo V	Oxidasa de lisilo
Enfermedad de Niemann-Pick	Esfingomielinasa	Síndrome de Richner-Hanhart	Aminotransferasa de tirosina
Enfermedad de Refsum	Oxidasa del ácido fitánico	Xerodermia pigmentosa	Endonucleasa específica de ultravioleta

* La gota debida al incremento de la actividad de PRPP es la única enfermedad de la lista debida a una *mayor* actividad enzimática.
Tomado de: Victor A. McKusick, *Mendelian Inheritance in Man*, 4.ª ed. Copyright © 1975 de Johns Hopkins University Press.

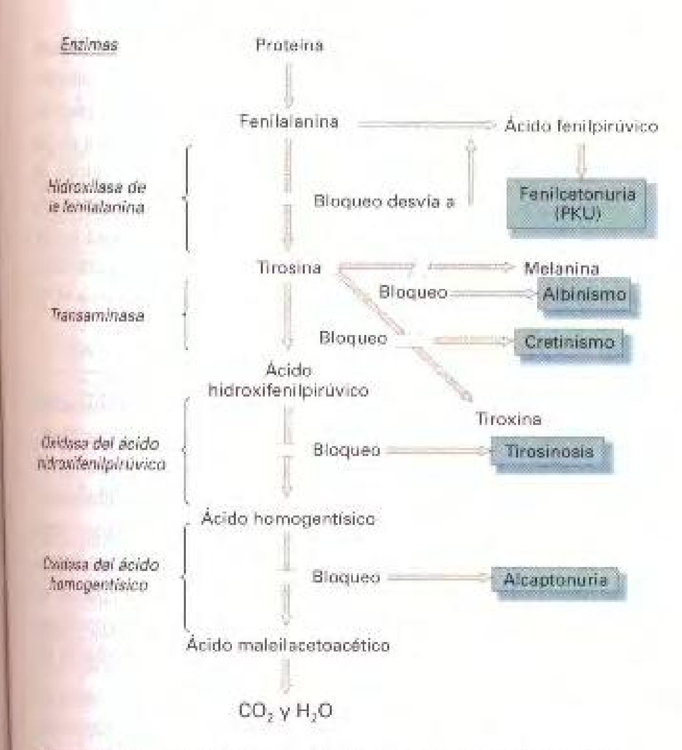


Figura 9-21. Una mínima parte del mapa metabólico humano, en la que se aprecian las consecuencias de la falta de varias enzimas específicas. (Los fenotipos enfermos se indican en recuadros coloreados.) (Según I. M. Lerner y W. J. Libby, *Heredity, Evolution, and Society*, 2.ª ed. Copyright © 1976 de W. H. Freeman and Company.)

Genes y metabolismo celular: las enfermedades genéticas

Cuando consideramos la actividad de una enzima en relación con el metabolismo celular, nos damos cuenta que la inactivación de una o más enzimas puede tener consecuencias sorprendentes. La mayoría de nosotros nos hemos asombrado alguna vez ante esos carteles colgados en las paredes de los laboratorios, en los que se muestran miríadas de rutas metabólicas, conectadas entre sí, ramificadas o formando anillos, por las que circulan los metabolitos celulares intermediarios como piezas de una cadena de montaje. Se rompen enlaces, se cortan moléculas, se unen moléculas, se añaden o se quitan radicales, etc. El hecho fundamental es que prácticamente cada paso, representado en el mapa metabólico por una flecha, está controlado (mediado) por una enzima, y cada una de estas enzimas se fabrica bajo la dirección de un gen que especifica su función. Toda la cadena de montaje puede venirse abajo si se produce un cambio en un gen único.

Los seres humanos ofrecemos ejemplos llamativos. El Cuadro 9-4 muestra algunos casos representativos, a la vez que da una idea de la magnitud de la influencia genética en las enfermedades humanas. La Figura 9-21 muestra un rincón del mapa metabólico e ilustra cómo surgen una serie de enfermedades, algunas de ellas muy comunes y familiares para nosotros, provocadas por el bloqueo de pasos sucesivos de rutas biosintéticas.



Figura 9-22. Esquema de la distorsión de la conformación de una proteína, causa probable de la sensibilidad a la temperatura de algunos mutantes. Un cambio de aminoácido que no tiene consecuencias significativas a temperaturas normales (permisivas), puede provocar una distorsión notable a temperaturas anormales (restrictivas).

Observaciones genéticas explicadas por la estructura de las enzimas

Armados con el conocimiento de la relación gen-proteína y de cómo funcionan las enzimas, podemos ahora reexaminar algunos de los descubrimientos genéticos presentados en capítulos anteriores y analizarlos en relación con la bioquímica implicada.

Un buen ejemplo puede encontrarse en los **alelos sensibles a la temperatura**. Recuerde que algunos mutantes se comportan como silvestres a temperatura normal y como mutantes a temperaturas altas o bajas. Ahora podemos explicar estas mutaciones, suponiendo que el cambio de un aminoácido produce una proteína funcional a temperaturas normales, llamadas temperaturas **permisivas**, pero distorsionada e inactiva a temperaturas altas o bajas, denominadas temperaturas **restrictivas** (Fig. 9-22).

Como ya hemos visto, las mutaciones condicionales, como las sensibles a la temperatura, pueden ser de gran utilidad para los genetistas. Las estirpes mutantes pueden mantenerse con facilidad en condiciones permisivas y el fenotipo alterado puede estudiarse en condiciones restrictivas. Resultan así muy útiles en la disección genética de los sistemas biológicos. Por ejemplo, utilizando un alelo sensible a la temperatura puede determinarse el momento preciso del desarrollo en que actúa un gen, cambiando a la temperatura restrictiva en momentos distintos del mismo.

Estructura fina del gen

Hasta los años 50 del siglo XX, el análisis genético y citológico llevó al concepto de cromosoma como una agrupación lineal (unidimensional) de genes, enlazados como si fueran cuentas de un collar sin cerrar. De hecho, este modelo se denomina a veces **teoría del collar de cuentas**. De acuerdo con esta teoría, la existencia de un gen como unidad de herencia es reconocida por sus alelos mutantes. Un alelo mutante altera un solo carácter fenotípico, se localiza en un locus cromosómico, produce un fenotipo mutante cuando se empareja consigo mismo y segrega de acuerdo con proporciones mendelianas cuando participa en cruzamientos. Merece la pena recalcar algunos aspectos de esta teoría del collar de cuentas:

1. El gen se considera como una unidad de *estructura*, no divisible mediante entrecruzamiento. Éste tiene lugar sólo entre genes (las cuentas en este modelo), pero nunca dentro del gen.

2. El gen se considera la unidad fundamental de *cambio*, o mutación. Cambia como un todo de una forma alélica a otra, pero no existen dentro de él componentes más pequeños que puedan cambiar.
3. El gen se considera como la unidad básica de *función* (aunque en el modelo no se especifique su función precisa). Las partes de un gen, si existieran, no son funcionales.

Llegados a este punto, ¿cómo podemos reconciliar el hecho de que el gen es una secuencia de nucleótidos con la idea de que el gen es la unidad mínima de mutación y recombinación? Los trabajos de Seymour Benzer, en los años 50, demostraron que la teoría del collar de cuentas no era correcta. Benzer demostró que era correcto considerar al gen como unidad de función, pero éste podía subdividirse en porciones más pequeñas, dispuestas linealmente, capaces de mutar y de recombinar. Sabemos hoy que la unidad de mutación y recombinación más pequeña equivale a un solo par de nucleótidos.

Recombinación intragénica

Benzer utilizó el sistema *rII*, descrito en el Capítulo 7, para detectar niveles muy bajos de recombinación en el fago T4. Benzer empezó con una muestra de ocho estirpes mutantes *rII* independientes, que cruzó en todas las combinaciones de parejas posibles mediante infección doble de *E. coli* B y posterior siembra de los fagos resultantes en un césped de *E. coli* K. Mediante el cálculo de las frecuencias de recombinación, pudo localizar cada mutación sin ambigüedad, a la derecha o a la izquierda de otra, para acabar produciendo lo que hoy llamamos un **mapa genético** (en este caso, las unidades de mapa son las frecuencias de halos de lisis rII^+

rII^1 rII^7 rII^4 rII^5 rII^2 rII^8 rII^3 rII

La recombinación dentro de un gen, llamada **recombinación intragénica**, parece más bien la regla que la excepción. Puede observarse prácticamente en cualquier locus, si se cuenta con el sistema adecuado de selección para detectar los recombinantes. En otras palabras, un alelo mutante puede representarse como una porción de material genético (el gen) que contiene un daño en una parte no silvestre: un **sitio de mutación**. Este daño parcial es el que provoca el fenotipo no silvestre. Distintos alelos producen diferentes efectos fenotípicos porque el daño se ha producido en sitios distintos del alelo silvestre.

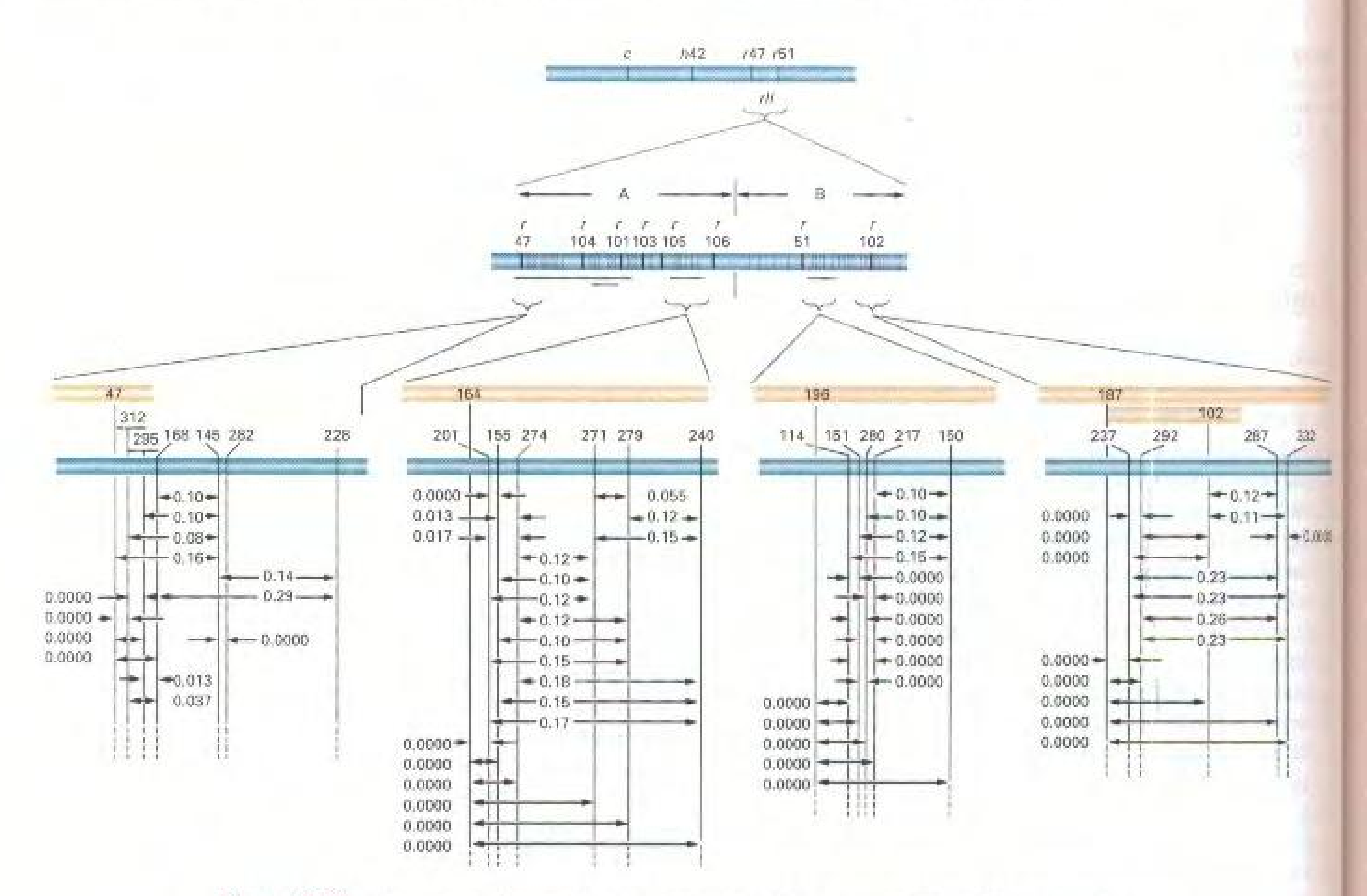
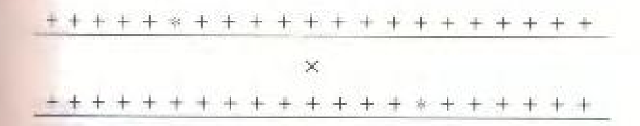


Figura 9-23. Mapa de recombinación detallado de la región *rII* del cromosoma del fago T4. La unidad de mapa es el porcentaje de recombinantes rII^+ en los cruzamientos entre mutantes *rII*. Algunas zonas representativas se han ampliado. Los números que están sobre el mapa representan sitios mutados; los números 47, 64, 196, 187 y 102 representan deleciones. Recuerde que las dos partes de la región *rII*, A y B, constituyen dos unidades funcionales distintas, según se describe más adelante en el texto. (Según S. Benzer, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 41, 1955, 344. Tomado de G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.ª ed. Copyright © 1978 de W. H. Freeman and Company.)

Así, un alelo a^1 puede representarse como:

+ + + + + * + + + + + + + + + + + + + + + +

Donde el asterisco (*) es el sitio mutado dentro de un gen que por lo demás es normal (representado por los sitios señalados con signo +). El cruzamiento entre un alelo a^1 y otro a^2 puede representarse como:



Es fácil ver cómo puede generarse la versión silvestre del gen

+ +

mediante un entrecruzamiento único en cualquier lugar situado entre los dos sitios de las mutaciones.

Benzer demostró que, contrariamente a la visión clásica, los genes no son indivisibles y pueden subdividirse por recombinación. Benzer extendió su estudio a cientos de alelos *rII*, lo que le permitió observar que la frecuencia de recombinación mínima entre un par de alelos mutantes distintos era del 0.01 %, aun cuando su sistema analítico era capaz de detectar frecuencias de recombinación tan bajas como del 0.0001 %, si ocurrieran. Esto le llevó a la idea de que los genes se componían de pequeños elementos, y que la recombinación podía ocurrir entre, pero no dentro de, esos elementos. Actualmente sabemos que la unidad de recombinación más pequeña es un par de nucleótidos.

COROLARIO

Un gen está compuesto de subelementos que pueden recombinar. El subelemento más pequeño que no es divisible por recombinación es un par de nucleótidos.

La existencia de recombinación intragénica nos permite elaborar mapas genéticos detallados, como el mapa de la región *rII* que se muestra en la Figura 9-23. Las frecuencias relativas de recombinantes intragénicos en cruzamientos entre varias mutaciones nos permite determinar el orden y las posiciones relativas de los sitios de mutación dentro de un gen. Hay que hacer notar que la recombinación *dentro* de un gen es lo mismo que la recombinación *entre* genes, excepto que la escala es distinta.

Sitios de mutación

Benzer explotó las propiedades de las deleciones parciales para localizar rápidamente nuevas mutaciones puntuales en segmentos concretos del gen *rII*, un procedimiento denominado **cartografía genética mediante deleciones**.

Uso de las deleciones en la cartografía genética de los sitios de mutación

Las deleciones son mutaciones que resultan de la eliminación de trozos de DNA. Las deleciones pueden cruzarse entre sí y cartografiarse exactamente igual que las mutaciones puntuales. La región delecionada se representa esquemáticamente como una barra. Si en un cruzamiento entre dos deleciones distintas no aparecen recombinantes silvestres, entonces las barras se representan una superpuesta sobra la otra. Un mapa típico de deleción podría ser el siguiente:

Estos mapas de deleción son útiles para delimitar regiones de un gen a las que pueden asignarse nuevas mutaciones puntuales. La lógica es que una mutación no puede dar lugar a recombinantes silvestres cuando se cruza con deleciones en las que no está presente el DNA correspondiente a la región silvestre de esa mutación. Por tanto, las mutaciones pueden ordenarse rápidamente mediante cruzamiento con una batería de deleciones, sin necesidad de extensas medidas cuantitativas.

Cartografía genética de la región *rII* mediante deleciones

Benzer llevó a cabo el análisis de la forma siguiente. Por ejemplo, considere el siguiente mapa genético que tiene 12 sitios de mutación identificables:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

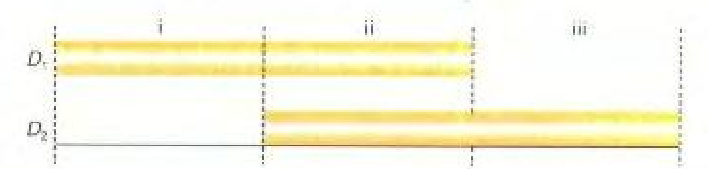
Supongamos que un mutante especial, D_1, no produce recombinantes rII^+ cuando se cruza con mutantes que tienen alterado el sitio *1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8*. Por tanto, D_1, se comporta como si llevara una deleción que va desde el sitio 1 al 8:

9 10 11 12

Otro mutante, D_2, no produce recombinantes rII^+ cuando se cruza con mutantes en el sitio *5, 6, 7, 8, 9, 10, 11* ó *12*. Por tanto, D_2 se comporta como si llevara una deleción que va desde el sitio 5 al 12:

1 2 3 4

Estas deleciones superpuestas definen ahora tres áreas del gen. Llamémoslas i, ii e iii:



Un mutante nuevo que produzca recombinantes rII^+ al cruzarse con D_1, pero no al cruzarse con D_2 estará mutado en un sitio localizado en el área iii. Uno que produzca recombinantes rII^+ al cruzarse con D_2 pero no con D_1, estará mutado en el área i. Uno que no produzca recombinantes rII^+ ni con D_1 ni con D_2 estará mutado en el área ii. Supongamos, por ejemplo, que cruzamos

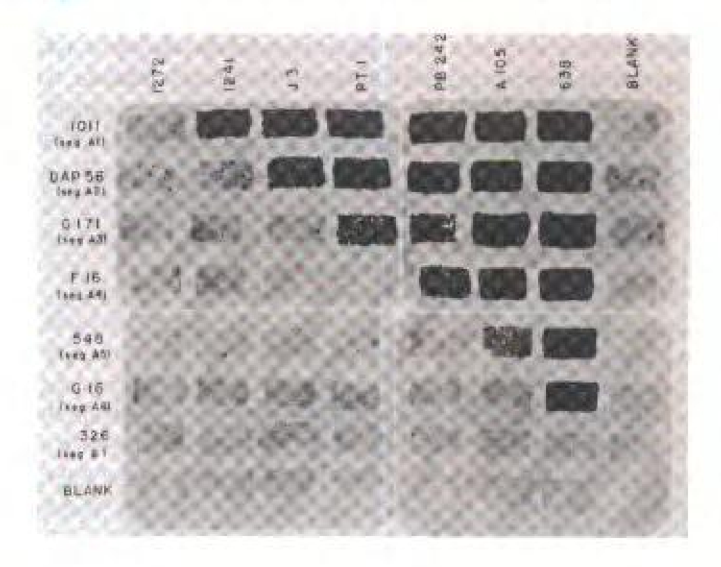
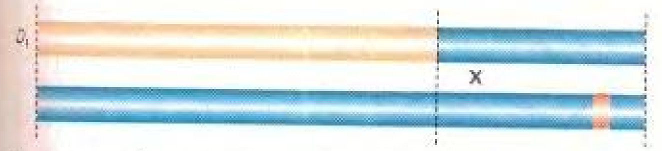


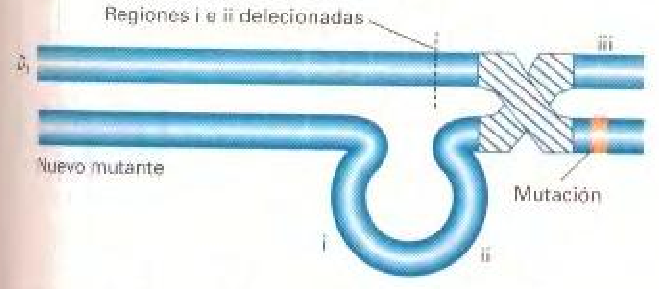
Figura 9-24. Cruzamientos para cartografiar mutaciones *rII*. La fotografía es una composición de cuatro placas. Cada línea corresponde a un determinado fago mutante probado frente a las deleciones de referencia de la Figura 9-25. Los resultados sitúan a cada mutación en un segmento distinto. Los halos de lisis que aparecen en los controles se deben a revertientes presentes en la suspensión de fagos mutantes.

Figura 9-25. Mapa de deleción detallado del gen *rII*. Cada deleción (líneas horizontales) se identifica con un número. A lo largo del borde inferior de la figura aparecen números arbitrarios que identifican regiones definidas por las deleciones. Observe que algunas deleciones se extienden fuera del gen *rII*. (Tomado de G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.ª ed. Copyright © 1978 de W. H. Freeman and Company. Según S. Benzer, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 47, 1961, 403-416.)

un mutante del área iii con D_1. Un esquema del cruzamiento puede ser el siguiente, donde el sitio de la mutación se representa con una barra roja:



En concreto, el apareamiento real es el siguiente:



Cuantas más deleciones haya en la batería de deleciones, mayor será el número de áreas definidas y más rápidamente podremos localizar nuevos sitios de mutación (Fig. 9-24). Una vez que una mutación ha sido asignada a una región, puede cruzarse con otros alelos de la misma región para establecer así su posición exacta. La Figura 9-25 muestra la gran complejidad del mapa que generó Benzer.

Análisis de los sitios de mutación

La utilización de deleciones permitió a Benzer definir la **topología** del gen: la forma en que están interconectadas sus distintas partes. Sus experimentos genéticos demostraron que el gen consiste en una agrupación lineal de subelementos mutables. El siguiente paso fue examinar la **topografía** del gen: las diferencias en las propiedades de cada subelemento. En la práctica, Benzer determinó estas diferencias analizando si todos los subelementos o sitios eran igualmente mutables o si las mutaciones se acumulaban en algunos sitios y eran raras en otros. Para este tipo de estudio, resulta esencial el empleo de los subelementos mutables más pequeños posibles. Benzer empleó mutaciones reversibles, que probablemente correspondían a alteraciones pequeñas o mutaciones puntuales, en lugar de mutaciones multisitio (deleciones) que no revierten. Además, descartó también los mutantes con frecuencias de reversión muy altas, ya que la reversión muy frecuente interfiere con las pruebas de recombinación.

Benzer utilizó sus mutantes de deleción para localizar rápidamente cada una de las mutaciones puntuales. Localizó primero cada sitio de mutación en una zona de deleción pequeña, y luego cruzó todas las mutaciones situadas en esa zona entre sí. Dos mutaciones reversibles que no recombinasen entre sí corresponderían a mutaciones en el mismo sitio.

La Figura 9-26 muestra la distribución 1612 mutaciones espontáneas en el locus *rII*. En las propias palabras de Benzer, «salta a la vista que la distribución no es aleatoria». Esta extraordinaria distribución no aleatoria demuestra que todos los sitios no son igualmente mutables. A los sitios que son más mutables que otros, Benzer los llamó **puntos calientes**. El punto caliente más destacado estaba representado por más de 500 hechos repetidos, del total de 1612 mutaciones de la colección. Teniendo en cuenta una distribución de Poisson ajustada a las frecuencias de sitios con sólo uno o dos hechos de mutación (Fig. 9-27), Benzer demostró que al menos 60 sitios eran realmente más mutables que aquéllos con uno o dos hechos de mutación. Además, en esta colección no observó (por azar) mutaciones en al menos 129 sitios, aunque análisis posteriores demostraron que estos sitios eran tan mutables como aquéllos representados por uno o dos hechos de mutación. Cuando Benzer extendió el análisis a mutaciones inducidas por mutágenos, observó el mismo resultado: también había puntos calientes, aunque con frecuencia eran distintos a los puntos calientes de las mutaciones espontáneas (véase el Cap. 16).

El tamaño del sitio de mutación también fue estudiado. Puede utilizarse el tamaño físico de la región *rII* para calcular el número aproximado de pares de bases de la misma. A partir de este número, se estimó que el número de sitios de mutación era aproximadamente del orden de la quinta parte del número de pares de bases. En otras palabras, el sitio mutable más pequeño era de cinco o menos pares de nucleótidos. El desciframiento del código genético (Cap. 10), junto con la demostración de Ingram, Yanofsky y otros (descrita anteriormente en este capítulo) de que el cambio de un aminoácido era consecuencia de una sola mutación, permitió a Benzer concluir que una mutación podría ser el resultado de la alteración de un solo par de nucleótidos. (La secuenciación directa del DNA, descrita en el Capítulo 12, confirmaría posteriormente esta conclusión en muchos casos distintos).

COROLARIO

El gen puede dividirse en subelementos mutables, dispuestos linealmente, que corresponden a pares de nucleótidos individuales.

Rechazo de la teoría del collar de cuentas

Analicemos de nuevo la teoría del collar de cuentas a la luz del trabajo de Benzer. Benzer fue capaz de localizar y ordenar un número enorme de mutaciones del locus *rII*, con la ayuda de la cartografía genética mediante deleciones. Sus experimentos demostraron que distintas mutaciones de un mismo gen pueden recombinar entre sí. Este resultado contradice la teoría clásica del collar de cuentas que postulaba que la recombinación podía ocurrir entre genes distintos, pero no dentro de un mismo gen.

El análisis de la estructura fina del gen realizado por Benzer demostró que cada gen está constituido por una serie de subelementos alineados que pueden alterarse por mutación y recombinar. Este descubrimiento contradice también otro de los principios de la teoría del collar de cuentas que suponía que sólo el gen como un todo puede mutar, no partes del mismo.

Trabajos posteriores de varios investigadores identificaron cada sitio genético con un par de bases del DNA de doble cadena. Por lo tanto, la contribución de Benzer estableció un puente sobre la bahía que separaba la genética clásica y el conocimiento desvelado por Watson y Crick sobre la estructura química del DNA. Según la teoría del collar de cuentas, la estructura de Watson y Crick no tendría sentido. Sin embargo, la demostración de Benzer de que en realidad los genes tienen una estructura más fina que puede evidenciarse sólo con el análisis genético, permitió la conexión entre las dos disciplinas y ayudó al lanzamiento de

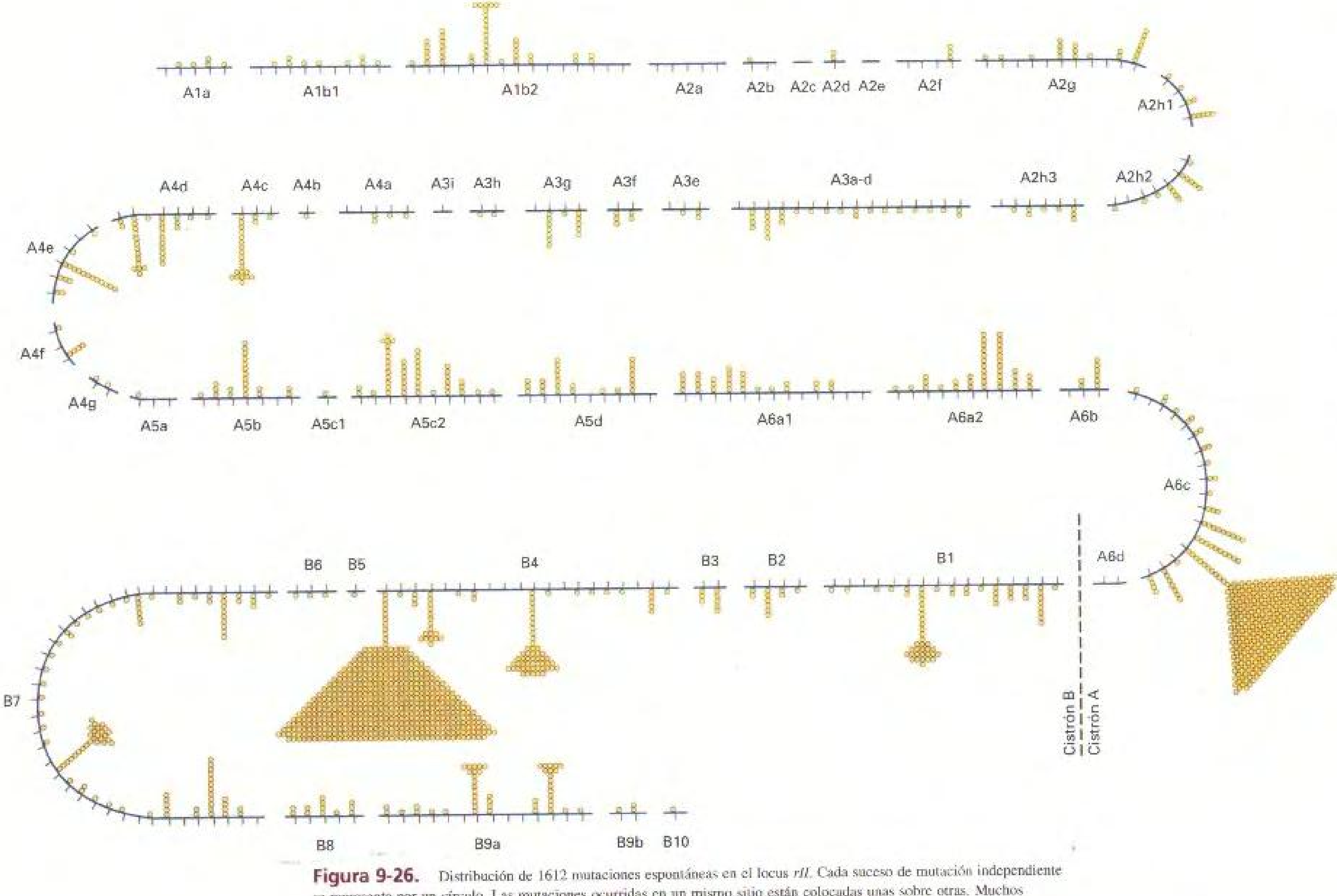
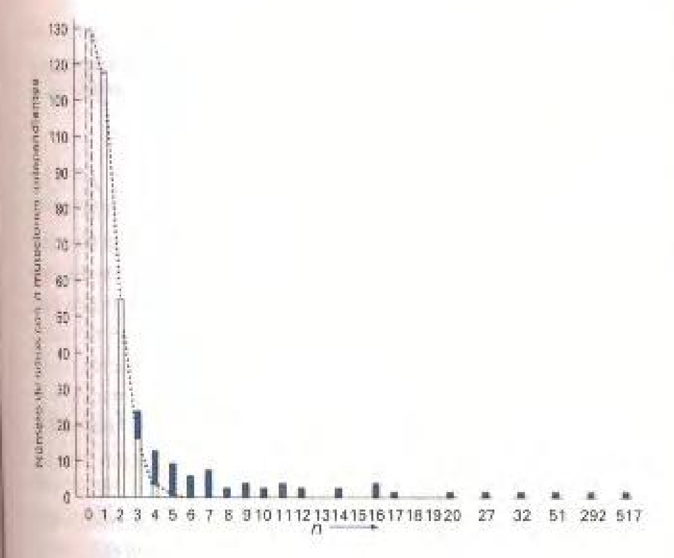


Figura 9-26. Distribución de 1612 mutaciones espontáneas en el locus *rII*. Cada suceso de mutación independiente se representa por un círculo. Las mutaciones ocurridas en un mismo sitio están colocadas unas sobre otras. Muchos sitios están representados por un solo círculo, mientras que otros tienen un número grande de círculos. Estos últimos se llaman *puntos calientes*. Se indican en el esquema los dos genes (originalmente denominados cistrones), *A* y *B*, de la región *rII*.



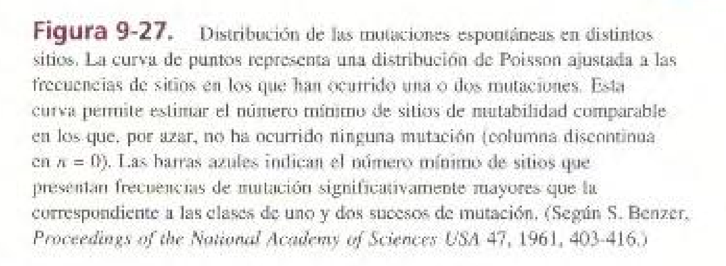


Figura 9-27. Distribución de las mutaciones espontáneas en distintos sitios. La curva de puntos representa una distribución de Poisson ajustada a las frecuencias de sitios en los que han ocurrido una o dos mutaciones. Esta curva permite estimar el número mínimo de sitios de mutabilidad comparable en los que, por azar, no ha ocurrido ninguna mutación (columna discontinua en $n = 0$). Las barras azules indican el número mínimo de sitios que presentan frecuencias de mutación significativamente mayores que la correspondiente a las clases de uno y dos sucesos de mutación. (Según S. Benzer, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 47, 1961, 403-416.)

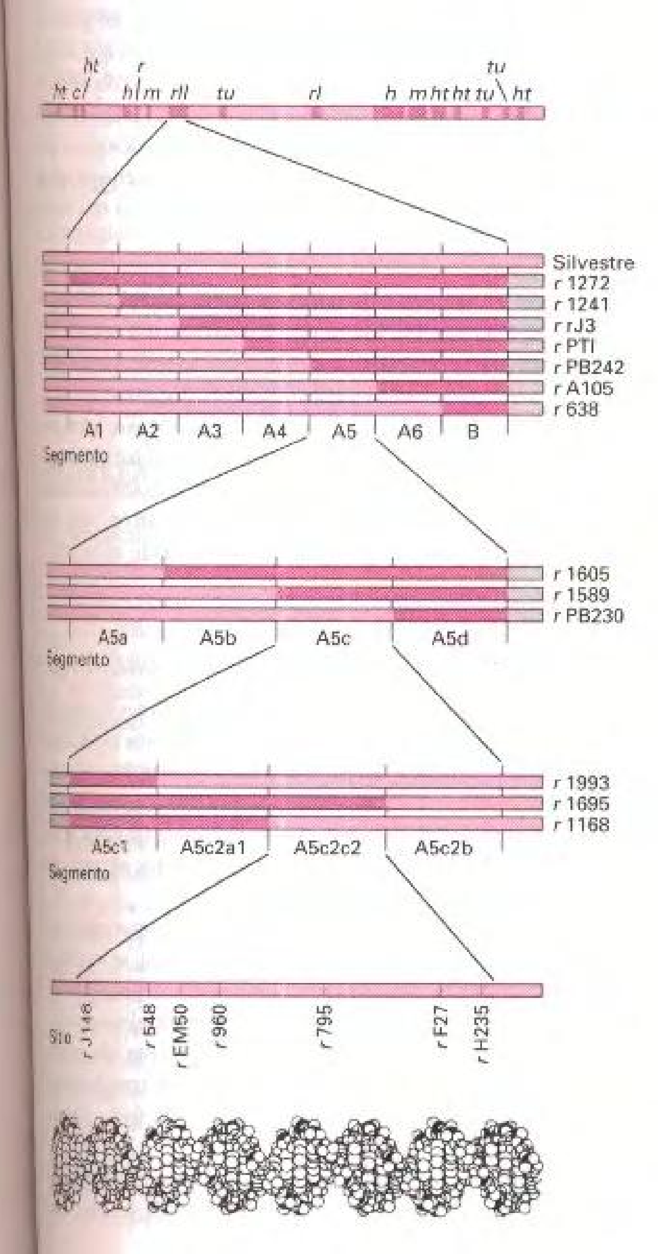


Figura 9-28. Análisis de la estructura fina del locus *rII*. Esta técnica cartográfica sitúa la posición de una mutación determinada en segmentos de la molécula de DNA del fago T4 cada vez menores. La región *rII* se representa al principio como una zona pequeña de la molécula completa (*parte superior*). La cartografía se hace cruzando el mutante no caracterizado todavía con mutantes de referencia, que contienen deleciones de la región *rII* de extensión conocida (en rosa oscuro). Cada sitio representa la unidad mutable más pequeña de la molécula de DNA, un solo par de bases. El segmento de la molécula de DNA (*parte inferior*), aproximadamente a escala, contiene un total de 40 pares de bases. (Tomado de S. Benzer, «The Fine Structure of the gene», Copyright © 1962 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

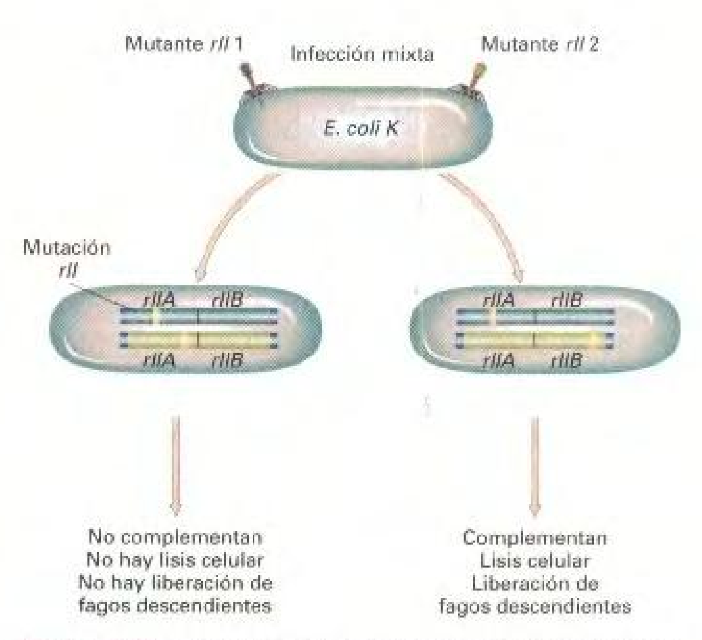


Figura 9-29. Prueba de complementación: esquema de complementación en el locus *rII*. Se infecta *E. coli* K simultáneamente con dos mutantes *rII* distintos (infección mixta). Normalmente, un mutante *rII* no puede lisar a *E. coli* K ni genera fagos descendientes. Sin embargo, si los dos mutantes distintos complementan, se produce la multiplicación de los fagos y la lisis. Si los dos mutantes no complementan, no hay multiplicación de fagos ni lisis.

la era moderna de la Genética molecular. La Figura 9-28 ilustra la disección del locus *rII* y su relación con la estructura del DNA.

Complementación

En otra parte de sus estudios, Benzer llevó a cabo una serie de experimentos diseñados para definir el gen en términos de función. Benzer estudió así el concepto de **complementación**. Quería averiguar si toda la región *rII* del fago T4 funciona como una unidad funcional única, o si está constituida por subunidades que funcionan independientemente. Para ello, analizó las mutaciones de la región *rII* que había cartografiado para ver si combinaciones de parejas de las mismas restauraban el fenotipo silvestre. En otras palabras, Benzer buscaba la complementación en células hospedadoras de *E. coli* temporalmente «diploides» para el cromosoma de T4. Para hacerlo, llevó a cabo infecciones mixtas con diferentes parejas de mutantes *rII* (Fig. 9-29). Su criterio de fenotipo silvestre fue la capacidad de lisar a la estirpe *E. coli* K (recuerde que los mutantes *rII* no pueden hacerlo, pero los silvestres sí).

Pruebas de complementación como las realizadas por Benzer se llevan a cabo en un solo ciclo de infección; no requieren los múltiples ciclos de infección que se necesitan para la formación de halos de lisis. Se extienden muestras de los dos fagos a estudiar sobre bacterias hospedadoras colocadas en una zona de una placa de petri, con una relación de fagos por bacteria elevada que asegure que prácticamente todas las bacterias sean infectadas por los dos fagos. Tras un período de incubación, el crecimiento o no de la bacteria en la zona correspondiente indica si han sido o no lisadas, como resultado de la infección.

Es importante entender la diferencia entre recombinación y complementación. La recombinación representa la creación de nuevas combinaciones de genes mediante rotura y unión de los cromosomas. La descendencia de un cruzamiento en el que se produce recombinación contiene *genotipos nuevos*, distintos de los genotipos parentales. En cambio, la complementación no implica cambio alguno de los genotipos de los cromosomas individuales, más bien representa una *mezcla de productos génicos*. La complementación ocurre durante el tiempo en que los dos cromosomas están en la misma célula y cada uno aporta una función. Después, los cromosomas respectivos permanecen inalterados. En el caso de los mutantes *rII*, la complementación ocurre cuando dos cromosomas de fagos diferentes, con mutaciones en distintos genes *rII*, se encuentran en la misma célula. Sin embargo, la descendencia derivada de esta complementación contiene sólo genotipos parentales.

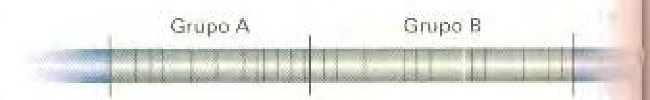


Figura 9-30. Mapa génico de la región *rII*.

Las pruebas de complementación por parejas con muchos mutantes diferentes llevaron a Benzer a separar las mutaciones en dos grupos, llamados A y B. Todas las mutaciones del grupo A complementaban con todas las del grupo B, mientras que ninguna de las mutaciones del grupo A complementaba con ninguna otra del grupo A, ni ninguna de las mutaciones del grupo B complementaba con ninguna otra del grupo B. Benzer descubrió que todas las mutaciones del grupo A estaban situadas en una mitad del locus *rII*, y todas las mutaciones del grupo B en la otra mitad del locus *rII* (Fig. 9-30).

¿Qué significado tienen los resultados de las pruebas de complementación de Benzer? Estudiamos en el Capítulo 4 que la falta de complementación indica que las mutaciones se localizan en un mismo gen. Por tanto, tenemos que concluir que los grupos *rIIA* y *rIIB* representan genes distintos, localizados uno al lado del otro en el cromosoma. Benzer llamó *cistrones* a los grupos de complementación *rIIA* y *rIIB*. En la actualidad, equiparamos cistrón con gen y consideramos que los genes son las unidades de función de la herencia. El término cistrón, que fue popular durante algunos años, ahora prácticamente no se usa.

RESUMEN

El trabajo de Beadle y Tatum, en los años 40 del siglo pasado, demostró que un gen determina una proteína, que a menudo es una enzima. El fallo en el funcionamiento normal de una enzima, debido a una mutación, produce una variación fenotípica. En muchas ocasiones, estas variaciones fenotípicas son la base de enfermedades genéticas en los organismos, incluido el hombre. Para entender de qué manera las enzimas anormales producen un cambio fenotípico necesitamos comprender la estructura de las proteínas. Las proteínas, constituidas por una secuencia lineal específica de aminoácidos conectados por enlaces peptídicos, adquieren formas tridimensionales concretas, como resultado de las interacciones entre los 20 aminoácidos que, en distintas combinaciones, constituyen las cadenas polipeptídicas. Distintas zonas de estas cadenas plegadas constituyen sitios de interacción y unión de los sustratos. Por otro lado, muchas enzimas funcionales y otras proteínas están formadas por la combinación de varias cadenas polipeptídicas, dando lugar a una estructura multimérica.

Mediante la técnica de la huella cromatográfica y la secuenciación de aminoácidos, pueden detectarse cambios específicos de aminoácidos en una proteína. Trabajos de este tipo, realizados por Sanger, Ingram, Yanofsky y otros, demostraron la colinealidad existente entre los sitios de mutación de un mapa genético y las posiciones que ocupan los aminoácidos alterados en una proteína.

Estudios posteriores de Benzer y otros demostraron que el gen puede dividirse en piezas más y más pequeñas. Así, se identificó la unidad de mutación y la de recombinación, que resultaron ser equivalentes a un par de nucleótidos. Un gen (inicialmente denominado cistrón) se define a nivel fenotípico como una región genética entre cuyas mutaciones no se produce complementación. Esta unidad determina la estructura de un único péptido funcional.

En los comienzos de la Genética, los genes se imaginaban como cuentas indivisibles de un collar. Hoy día tenemos un

imagen muy distinta del gen. Éste posee muchos sitios de mutación y puede producirse un hecho de recombinación en cualquier sitio dentro del mismo. Además, al establecer que un gen es responsable de la síntesis de un polipéptido, hemos estrechado la relación entre genotipo y fenotipo.

Mapa de conceptos

Trace un mapa de conceptos, relacionando entre sí tantos de los siguientes términos como le sea posible. Observe que los conceptos no están en ningún orden concreto.

Alelo / mutación / ruta biosintética / enzima / catálisis / auxótrofo / dominante / recesivo / complementación / cistrón / deleción / enlace peptídico / polipéptido / secuencia de aminoácidos / recombinación

Problema de integración de capítulos

Estudiamos en el Capítulo 4 que el alelo silvestre del gen de la hemoglobina, Hb^A, es dominante sobre Hb^S (el alelo de la anemia falciforme) con respecto a la anemia, pero es codominante con respecto a las propiedades electroforéticas. Explique los diferentes tipos de dominancia en relación con la secuencia de la proteína, basándose en los conocimientos adquiridos en este capítulo sobre la estructura de las proteínas.

♦ Solución ♦

La hemoglobina está formada por dos cadenas polipeptídicas α y dos β, estrechamente unidas en una estructura cuaternaria compleja que aloja los grupos hemo que llevan el oxígeno a los tejidos. La estructura primaria de la proteína (secuencia lineal de sus aminoácidos) determina las estructuras terciaria y cuaternaria finales de la proteína y, por lo tanto, su actividad. Debido al cambio de un glutámico por una valina en la posición 6 de la cadena β, se produce un cambio estructural de la proteína que da lugar a la hemoglobina de la anemia falciforme (HbS), la cual transporta el oxígeno menos eficientemente que la hemoglobina normal de adultos (HbA). Los individuos heterocigóticos (Hb^A/Hb^S) mantienen una capacidad de transporte de oxígeno suficiente para no mostrar los síntomas severos de la anemia, por eso, Hb^A muestra dominancia sobre Hb^S con respecto a la anemia. La sustitución de glutámico por valina cambia la carga eléctrica de la molécula, de forma que HbS se mueve más despacio que HbA en una electroforesis en gel (véase la Fig. 4-4). Así, las dos moléculas de hemoglobina (HbA y HbS) muestran codominancia con respecto a las propiedades electroforéticas, ya que pueden separarse y detectarse por esta técnica.

Problemas resueltos

1. Se infectan células de *E. coli* con varias parejas de mutantes *rII*, tanto en la configuración *cis* (= acoplamiento) como *trans* (= repulsión), y se compara el «tamaño de la explosión» (número medio de partículas virales producidas por cada fago) para cada pareja. Los resultados obtenidos con seis mutantes *r* distintos —*rM*, *rN*, *rO*, *rP* y *rS*— son los siguientes («+» representa el alelo silvestre):

Genotipo *cis*	Tamaño de la explosión	Genotipo *trans*	Tamaño de la explosión
rM rN/++	245	*rM* +/+ *rN*	250
rO rP/++	256	*rO* +/+ *rP*	268
rR rS/++	248	*rR* +/+ *rS*	242
rM rO/++	270	*rM* +/+ *rO*	0
rM rP/++	255	*rM* +/+ *rP*	255
rM rR/++	264	*rM* +/+ *rR*	0
rM rS/++	240	*rM* +/+ *rS*	240
rN rO/++	257	*rN* +/+ *rO*	268
rN rP/++	250	*rN* +/+ *rP*	0
rN rR/++	245	*rN* +/+ *rR*	255
rN rS/++	259	*rN* +/+ *rS*	0
rP rR/++	260	*rP* +/+ *rR*	245
rP rS/++	253	*rP* +/+ *rS*	0

Si asignamos la mutación *rO* al gen *A*, ¿dónde están situadas las otras cinco mutaciones respecto de los genes *A* y *B*? (**Nota**: este problema es similar al Problema 21 de la serie de problemas de este capítulo).

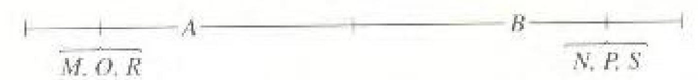
♦ Solución ♦

Para resolver problemas como éste, busque en primer lugar el principio básico subyacente, y luego intente dibujar un esquema que le sirva de ayuda para encontrar la solución. El principio básico es que dos mutaciones del mismo gen que se encuentren en configuración *trans* no complementan y, por tanto, no habrá multiplicación de los fagos (no hay «explosión»), mientras que dos mutaciones en genes distintos sí complementan y permitirán la aparición de fagos descendientes en un «tamaño de explosión» normal. Puesto que *rO* está en el gen *A*, empezaremos con este esquema inicial:



Ahora podemos mirar el resultado del experimento y asignar cada mutación a un gen, basándonos en si ocurre o no complementación en una infección mixta con el mutante *rO*. Del análi-

sis de los datos de la tabla es evidente que N y P complementan con O y deben estar en un gen distinto (gen B), mientras que M no complementa con O y debe estar en el mismo gen (gen A). Nos quedan sólo R y S, que pueden asignarse a los genes A y B, respectivamente, basándonos en los resultados de la complementación con M, N y P. Así pues, tenemos la siguiente disposición:



Podemos comprobar esta asignación examinando los demás cruzamientos, para averiguar si los resultados son consistentes con nuestra respuesta.

2. El mapa siguiente muestra cuatro deleciones (1 a 4) del gen *rIIA* del fago T4:

1 ________________
2 ______________________
3 ________________________
4 ______________________________

Se prueban cinco mutaciones puntuales (*a* a *e*) frente a estas cuatro deleciones y se comprueba la aparición (+) o no (−) de recombinantes silvestres (r^+). Los resultados son:

		a	*b*	*c*	*d*	*e*
Mutante	1	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	−	−
	3	+	−	+	−	−
	4	−	−	+	−	−

¿Cuál es el orden de las mutaciones puntuales?

♦ Solución ♦

En este caso, el principio básico es que las mutaciones puntuales pueden recombinar con deleciones que *no* engloben la región en la que se localiza dicha mutación puntual, pero no pueden recombinar, produciendo fagos silvestres, con deleciones que incluyan el sitio de la mutación puntual. En este problema concreto, cualquier mutación que recombine con la deleción 1 debe estar a la derecha de esta deleción, cualquiera que recombine con la deleción 2 debe estar a la derecha de la deleción 2 y así sucesivamente. Veamos qué pasa con la mutación puntual *a*. Recombina con las deleciones 1, 2 y 3, pero no con la deleción 4. Por tanto, debe estar a la derecha de las deleciones 1, 2 y 3, pero no de la deleción 4, es decir, podemos localizar la mutación en el intervalo entre las deleciones 3 y 4. La mutación puntual *b* recombina con las deleciones 1 y 2, por lo cual debe estar a la derecha de ellas. Al no recombinar con las deleciones 3 y 4, está en el intervalo entre las deleciones 2 y 3. La mutación puntual *c* recombina con todas las deleciones, así que está a la derecha de todas ellas, incluso de la deleción 4. Finalmente, tanto la mutación puntual *d* como *e* recombinan sólo con la deleción 1, así que deben estar en el intervalo entre las deleciones 1 y 2. La solución a la que hemos llegado puede resumirse de esta manera:

1 ________________ *e, d*
2 ______________________ *b*
3 ________________________ *a*
4 ______________________________ *c*

El Problema 25 de esta serie es similar a este problema modelo. Compruebe si puede aplicar el razonamiento expuesto aquí cuando resuelva el Problema 25.

PROBLEMAS

1. Describa la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de una proteína. Cuando sea posible indique algún ejemplo de cada tipo de estructura.

2. ¿Qué es la hipótesis un gen-una enzima?

3. ¿Qué es un auxótrofo?

4. ¿Cuál es el cambio concreto en la hemoglobina que provoca la anemia falciforme?

5. ¿Qué experimento realizó Yanofsky para demostrar la colinealidad entre el gen y la proteína?

6. ¿Cuál es la diferencia entre complementación y recombinación?

7. Complete la tabla siguiente indicando el fenotipo de los halos de lisis:

	ESTIRPE de *E. coli*	
Fago T4	B	K
rII	?	?
rII^+ (silvestre)	?	?

8. Una hierba común, la cebada de San Juan, es tóxica para animales albinos y produce ampollas en aquellos que presentan zonas blancas en su pelaje. Sugiera una posible base genética de estos hechos.

9. La galactosemia es una enfermedad humana que causa retraso mental a una edad temprana, debido a la incapacidad de digerir la lactosa de la leche, lo que afecta negativamente a las funciones cerebrales. ¿Qué tipo de tratamiento curativo secundario aplicaría a la galactosemia? ¿Espera que este fenotipo sea dominante o recesivo?

10. La amniocentesis es un método por el que se introduce una aguja hipodérmica hasta el amnios (el saco que rodea a un embrión en desarrollo) a través de la pared abdominal de la mujer embarazada, para extraer una pequeña cantidad de líquido amniótico. Éste contiene células del embrión (no de la madre). Las células pueden cultivarse, de manera que se dividan y formen una población celular suficiente para realizar ensayos enzimáticos y cariotípicos. ¿Qué aplicaciones tiene este método en el consejo genético? Cite al menos tres enfermedades concretas en las que la amniocentesis sería útil (**Nota**: esta técnica conlleva un riesgo pequeño, pero real, tanto para la madre como para el embrión. Tenga en cuenta este hecho en su respuesta).

11. La tabla adjunta muestra los niveles de actividad enzimática (en unidades que no tienen por qué preocuparnos) de las enzimas implicadas en dos enfermedades metabólicas recesivas humanas. Se dispone de una información similar para muchas otras metabolopatías hereditarias.

a. ¿Qué utilidad tiene esta información en el consejo genético?

b. Indique cualquier motivo de ambigüedad en la interpretación de los análisis de pacientes individuales.

c. A la luz de estos datos, revise el concepto de dominancia.

			NIVELES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	
Enfermedad	Enzima	Enfermos	Padres de los enfermos	Individuos normales
Acatalasia	Catalasa	0	1.2-2.7	4.3-6.2
Galactosemia	Transferasa de uridilo a Gal-1-P	0-6	9-30	25-40

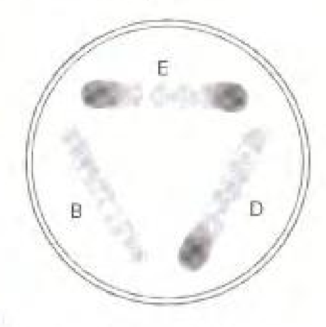
12. Dos albinos se casan y tienen un hijo normal. ¿Cómo es posible? Sugiera al menos dos explicaciones distintas.

13. La fenilcetonuria (PKU) es una enfermedad humana debida a un defecto enzimático en el paso A de la secuencia simplificada de reacciones que aparece más abajo. La alcaptonuria (AKU) se debe a un defecto enzimático en uno de los pasos resumidos como paso B:

$$\text{fenilalanina} \xrightarrow{A} \text{tirosina} \xrightarrow{B} CO_2 + H_2O$$

Una persona con PKU se casa con otra que padece AKU. ¿Qué fenotipos espera en sus hijos? ¿Todos normales, todos sólo con PKU, todos sólo con AKU, todos con PKU y AKU, o algunos con AKU y otros con PKU?

14. Tres estirpes de levadura que requieren triptófano, aisladas independientemente, se denominan TrpB, TrpD y TrpE. Una suspensión de células de cada una se cultiva en línea en una placa con la cantidad justa de triptófano para permitir un ligero crecimiento de las estirpes Trp^-. Las líneas se trazan formando un triángulo, sin que se toquen unas con otras. Tras incubación de la placa, se aprecia un gran crecimiento en ambos extremos de la línea de TrpE y en uno de los extremos de la línea TrpD.



*a. ¿Cree que es complementación lo que estamos observando?

b. Brevemente, explique la distribución de las zonas de mucho crecimiento.

c. ¿En qué orden se encuentran en la ruta de síntesis del triptófano los pasos enzimáticos alterados en TrpB, TrpC y TrpE?

d. ¿Por qué es necesario añadir una pequeña cantidad de triptófano al medio para observar este patrón de crecimiento?

15. En las pupas de *Drosophila*, ciertas estructuras denominadas *discos imaginales* aparecen como engrosamientos de la piel; tras la metamorfosis, se desarrollan en órganos específicos de la mosca adulta. Georde Beadle y Boris Ephrussi diseñaron un procedimiento para trasplantar el disco imaginal del ojo de una larva a otra, que actuaba como hospedadora. Cuando la hospedadora se convertía en adulto, el trasplante podía distinguirse como un ojo coloreado situado en el abdomen. Estos investigadores tomaron dos estirpes de la mosca fenotípicamente idénticas, en cuanto que ambas tenían ojos de color escarlata: en un caso debido a una mutación ligada al sexo (*v*) y en el otro a una mutación situada en el cromosoma 2 (*cn*). Si un disco *v* se trasplanta a un hospedador *v*, o un disco *cn* a un hospedador *cn*, los trasplantes se desarrollan como ojos mutantes de color escarlata. Discos *v* o *cn* trasplantados a los hospedadores silvestres se desarrollan como ojos de color silvestre. Un disco *cn* se desarrolla en un hospedador *v* como un ojo de color escarlata, pero un disco *v* se desarrolla en un hospedador *cn* como un ojo de color silvestre. Explique estos resultados y describa los experimentos que llevaría a cabo para comprobar su explicación.

16. En *Drosophila*, la mutación autosómica recesiva *bw* produce ojos de color marrón y la también autosómica recesiva *st*, no ligada a la primera, produce ojos de color escarlata. Un individuo homocigótico para ambas mutaciones tiene los ojos de color blanco. Así pues, tenemos la siguiente correspondencia entre genotipos y fenotipos:

st^+/st^+ ; bw^+/bw^+ = ojo rojo (silvestre)
st^+/st^+ ; bw/bw = ojo marrón
st/st ; bw^+/bw^+ = ojo escarlata
st/st ; bw/bw = ojo blanco

Dibuje una hipotética ruta de biosíntesis que muestre cómo interaccionan los productos génicos y por qué las distintas combinaciones mutantes tienen fenotipos diferentes.

17. Se aíslan varios mutantes que requieren el compuesto G para crecer. Se conocen los compuestos intermediarios de la ruta biosintética (A-E) que lleva hasta G, pero no el orden en el que aparecen en ella. Se analiza la capacidad de cada compuesto para permitir el crecimiento de cada mutante (1-5). Los resultados se recogen en la tabla siguiente, donde el signo «+» indica crecimiento y el signo «–» no crecimiento:

		Compuesto probado					
		A	B	C	D	E	G
Mutante	1	–	–	–	+	–	+
	2	–	+	–	+	–	+
	3	–	–	–	–	–	+
	4	–	+	+	+	–	+
	5	+	+	+	+	–	+

a. ¿En qué orden se encuentran los compuestos A-E en la ruta?

b. ¿En qué paso de la ruta está afectado cada mutante?

c. ¿Crecerá en medio mínimo un heterocarionte formado por los mutantes dobles 1,3 más 2,4? ¿Y 1,3 más 3,4? ¿Y 1,2 más 2,4 más 1,4?

18. Suponga que dos genes participan en la síntesis de valina en *Neurospora* (un organismo haploide). Sus alelos mutantes son *val-1* y *val-2*, y los correspondientes alelos silvestres $val\text{-}1^+$ y $val\text{-}2^+$. Los dos genes están ligados en el mismo cromosoma, ocurriendo un entrecruzamiento entre ellos en una de cada dos meiosis, como media.

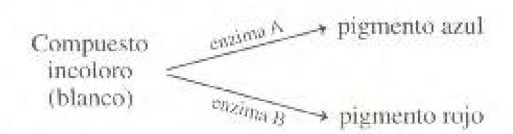
a. ¿Cuál es la proporción de meiosis en las que no se produce ningún entrecruzamiento entre los dos genes?

b. Utilice la función de mapa para determinar la frecuencia de recombinación entre estos dos genes.

c. Los descendientes del cruzamiento $val\text{-}1\ val\text{-}2^+ \times val\text{-}1^+\ val\text{-}2$ se siembran en cajas con medio sin valina. ¿Qué proporción de ellos crecerá?

d. Las estirpes $val\text{-}1\ val\text{-}2^+$ acumulan el compuesto intermediario B, mientras que las estirpes $val\text{-}1^+\ val\text{-}2$ acumulan el compuesto intermediario A. Las estirpes $val\text{-}1\ val\text{-}2^+$ crecen con valina o con A, pero las estirpes $val\text{-}1^+\ val\text{-}2$ crecen sólo con valina. Indique el orden de A y B en la ruta, respecto de la valina, y qué gen controla cada conversión.

19. Los pétalos de las flores de cierta planta son normalmente púrpuras. En dos plantas distintas han aparecido dos mutaciones recesivas que se encuentran en cromosomas distintos. La mutación 1 (m_1) produce pétalos azules en homocigosis ($m_1\ m_1$). La mutación 2 (m_2) produce pétalos rojos en homocigosis ($m_2\ m_2$). Bioquímicos que han trabajado en la síntesis de los pigmentos florales de esta especie habían descubierto previamente la ruta siguiente:



a. ¿Qué mutante espera que sea deficiente en la enzima A?

b. El genotipo de una planta es M_1/m_1 ; M_2/m_2. ¿Cuál espera que sea su fenotipo?

c. Si autofecundamos la planta del apartado **b**, ¿qué colores espera en la descendencia y en qué proporciones?

d. ¿Por qué estos mutantes son recesivos?

20. La síntesis del pigmento antocianina de los pétalos de guisante dulce está controlada por dos genes, *B* y *D*. La ruta es:

intermediario blanco $\xrightarrow{\text{enzima del gen } B}$ intermediario azul $\xrightarrow{\text{enzima del gen } D}$ antocianina (púrpura)

a. ¿Qué color de pétalos espera que tenga una línea pura incapaz de catalizar la primera reacción?

b. ¿Qué color de pétalos espera que tenga una línea pura incapaz de catalizar la segunda reacción?

c. Si cruzamos las plantas de los apartados **a** y **b**, ¿qué color de pétalos tendrán las plantas de la F_1?

d. ¿Qué relación entre plantas púrpura, azules y blancas espera en la F_2?

21. Se estudian varias parejas de mutantes *rII* del fago T4 en infecciones de *E. coli*, tanto en configuración *cis* (acoplamiento) como *trans* (repulsión). En cada caso, se compara el número medio de partículas virales producidas por cada bacteria (un valor denominado «tamaño de la explosión»). La tabla siguiente muestra los resultados obtenidos con seis mutantes *r* distintos (*rU*, *rV*, *rW*, *rX*, *rY* y *rZ*):

Genotipo *cis*	Tamaño de la explosión	Genotipo *trans*	Tamaño de la explosión
rU rV/+ +	250	*rU* +/+ *rV*	258
rW rX/+ +	255	*rW* +/+ *rX*	252
rY rZ/+ +	245	*rY* +/+ *rZ*	0
rU rW/+ +	260	*rU* +/+ *rW*	250
rU rX/+ +	270	*rU* +/+ *rX*	0
rU rY/+ +	253	*rU* +/+ *rY*	0
rU rZ/+ +	250	*rU* +/+ *rZ*	0
rV rW/+ +	270	*rV* +/+ *rW*	0
rV rX/+ +	263	*rV* +/+ *rX*	270
rV rY/+ +	240	*rV* +/+ *rY*	250
rV rZ/+ +	274	*rV* +/+ *rZ*	260
rW rY/+ +	260	*rW* +/+ *rY*	240
rW rZ/+ +	250	*rW* +/+ *rZ*	255

Si asignamos *rV* al gen *A*, ¿cuál es la localización de los otros cinco mutantes *rII* respecto a los genes *A* y *B*? (*Problema 21 tomado de M. Strickberger, Genetics*, Copyright © 1968 de Monroe W. Strickberger. Reproducido con permiso de Macmillan Publishing Co., Inc.).

22. Hay pruebas de que durante la meiosis, ocasionalmente uno o ambos centrómeros homólogos se dividen y se separan prematuramente en la primera división, en lugar de en la segunda, como sería normal. En *Neurospora*, los alelos *pan2* producen ascosporas de color pálido, las ascosporas abortadas son completamente incoloras y las ascosporas normales son negras. En un cruzamiento entre dos mutaciones que complementan entre sí, *pan2x* × *pan2y*, ¿qué relación entre ascoporas negras, pálidas e incoloras espera encontrar en las ascas que provienen de una meiosis con división precoz de un centrómero? ¿Y de ambos centrómeros? (Considere que *pan2* está muy cerca del centrómero.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	–	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	–
2	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–
3	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–
4	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–
5	–	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	–
6	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–
7	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–
8	–	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	–
9	–	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	–
10	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–
11	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–
12	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–
13	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–
14	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

23. *Protozoon mirabilis* es un alga verde, unicelular, haploide e hipotética, que se orienta hacia la luz mediante un orgánulo ocular rojo. Se han aislado 14 mutantes de orgánulo ocular blanco (*ojo*⁻), mediante selección de células que no se mueven hacia la luz. Es posible fusionar células haploides para producir individuos diploides. Se hace así con los 14 mutantes *ojo*⁻, en todas las combinaciones por parejas posibles, y se analiza el color del orgánulo ocular de cada diploide. Los resultados se recogen en la tabla de la parte superior de la página, en la que un signo «+» indica orgánulo ocular rojo y un signo «–» orgánulo ocular blanco.

a. El mutante 14 es claramente distinto del resto. ¿Qué puede ocurrirle?

b. Excluyendo al mutante 14, ¿cuántos grupos de complementación pueden establecerse y qué mutantes pertenecen a cada grupo?

c. Se hacen tres cruzamientos, cuyos resultados aparecen en la tabla siguiente:

Mutantes cruzados	NÚMERO DE DESCENDIENTES		
	ojo⁺	*ojo*⁻	Total
1 × 2	31	89	120
1 × 6	5	113	118
1 × 14	0	97	97

Explique estas proporciones genéticas utilizando símbolos.

d. ¿Cuántos loci genéticos están implicados en total y qué mutantes pertenececn a cada uno?

e. ¿Cómo están distribuidos estos loci? (Dibuje un mapa).

24. Tiene el siguiente mapa del locus *rII*:

Gen A *Gen B*
rX *rY* *rZ* *rD* *rE* *rF*

Imagine que aísla una nueva mutación, *rW*, que no complementa con ninguna de las mutaciones del gen *A*, ni con las del gen *B*. Descubre que puede obtener recombinantes silvestres en cruzamientos de la nueva mutación con las mutaciones *rX*, *rY*, *rE* ó *rF*, pero no con *rZ* o *rD*. Sugiera posibles explicaciones de estos resultados. Describa los experimentos que realizaría para someter a prueba dichas explicaciones.

25. El mapa siguiente muestra cuatro deleciones (1-4) del gen *rIIA* del fago T4:

1 ———
2 ——————
3 ————
4 ——

Se prueban cinco mutaciones puntuales de *rIIA* (*a-e*) frente a estas deleciones, respecto de la capacidad de generar recombinantes *r*⁺ (+) o no (–) en cruzamientos, con los resultados siguientes:

	a	*b*	*c*	*d*	*e*
1	+	+	–	+	+
2	+	+	–	–	–
3	–	–	+	–	+
4	+	–	+	+	+

a. ¿En qué orden están situadas las mutaciones puntuales?

b. Otra estirpe de T4 contiene una mutación puntual en el gen *rIIB*. Esta estirpe se mezcla por separado con cada uno de los mutantes de deleción, utilizándose las mezclas para infectar *E. coli* K, a una multiplicidad de infección suficiente para que cada bacteria sea infectada al menos por un mutante *rIIA* y uno *rIIB*. Aparecen halos de lisis normales con las deleciones 1, 2 y 3, pero no con la deleción 4. Suponiendo que el gen *B* se encuentra a la derecha del *A*, explique el comportamiento de la deleción 4. ¿Afecta esta explicación a su respuesta al apartado **a**?

26. Se cruzan por parejas distintas deleciones de un fago. Se obtienen los resultados siguientes («+» indica que se obtienen recombinantes silvestres):

	1	2	3	4	5
1	−	+	−	+	−
2	+	−	+	+	−
3	−	+	−	−	−
4	+	+	−	−	+
5	−	−	−	+	−

a. Elabore un mapa de deleción con estos datos.

b. El primer genetista en realizar un análisis cartográfico por deleción, en el mítico fago SH4 de los idiotas (que lisa a los idiotas), se encontró con esta serie de datos concluyentes:

	1	2	3	4
1	−	−	+	−
2	−	−	−	+
3	+	−	−	−
4	−	+	−	−

Demuestre por qué este resultado es concluyente, en el sentido de que sólo hay un mapa compatible con la tabla. (No se engañe a sí mismo con razonamientos convencionales).

27. Se obtienen cuatro alelos del gen *cys-2* de un organismo eucariótico haploide. Todos los alelos determinan auxotrofía para cisteína y se sitúan en el mismo locus. Las cuatro estirpes portadoras de los alelos se cruzan con la estirpe silvestre para obtener una serie de ocho estirpes, correspondientes a los cuatro alelos mutantes combinados con los dos tipos sexuales. A continuación, se cruzan los alelos mutantes entre sí, en todas las combinaciones de parejas posibles. Los productos haploides de cada cruzamiento se siembran en medio sin cisteína, observándose una baja frecuencia de protótrofos cys^+ en algunos cruzamientos. Los resultados se muestran en la tabla adjunta, en la que los números representan la frecuencia de colonias cys^+ por cada 10^4 productos meióticos sembrados:

		Tipo sexual A'			
		1	2	3	4
Tipo sexual A''	1	0	14	2	20
	2	14	0	12	6
	3	2	12	0	18
	4	20	6	18	0

a. Dibuje un mapa de los cuatro sitios mutados del gen *cys-2*, incluyendo las distancias relativas entre dichos sitios.

b. ¿Ve alguna prueba en los datos de que la mutación pueda estar interviniendo en la aparición de los protótrofos?

***28.** Existe un gen en *Neurospora* que controla la producción de adenina, cuyas mutaciones se denominan *ad-3*. A su izquierda, a 2 unidades de mapa, está el locus *his-2*, y a su derecha, a 3 unidades de mapa, está el locus *nic-2* (*his-2* controla la producción de histidina y *nic-2* la de nicotinamida). Así pues, el mapa es:



Se aíslan tres auxótrofos *ad-3* distintos: *ad-3*^{a}, *ad-3*^{b} y *ad-3*^{c} (identificados simplemente como *a*, *b* y *c*). Se llevan a cabo los cruzamientos siguientes:

Cruzamiento 1: *his-2*$^+$ *a nic-2*$^+$ × *his-2 b nic-2*
Cruzamiento 2: *his-2*$^+$ *a nic-2* × *his-2 c nic-2*$^+$
Cruzamiento 3: *his-2 b nic-2* × *his-2*$^+$ *c nic-2*$^+$

Se siembran las ascosporas en medio mínimo enriquecido con histidina y nicotinamida, analizándose posteriormente los protótrofos *ad-3*$^+$. La tabla siguiente muestra los resultados de este análisis.

Genotipos de los recombinantes *ad-3*$^+$	NÚMERO DE PROTÓTROFOS *ad-3*$^+$ ANALIZADOS		
	Cruzam. 1	Cruzam. 2	Cruzam. 3
his-2 nic-2	0	6	0
his-2$^+$ *nic-2*$^+$	0	0	0
his-2 nic-2$^+$	15	0	5
his-2$^+$ *nic-2*	0	0	0
N.º total de Protótrofos analizados	41 236	38 421	43 600

¿En qué orden se encuentran las mutaciones *ad-3* y cuál es la distancia genética entre ellas?

29. En un organismo diploide hipotético, la cuadratura de las células se debe a un efecto umbral, de manera que si en una célula hay más de 50 unidades del «factor de la cuadratura», ésta presenta el fenotipo cuadrado. Menos de 50 de dichas unidades produce un fenotipo redondo. El alelo s^f es un gen funcional que activa la síntesis del factor de la cuadratura, contribuyendo cada alelo con 40 unidades del mismo; así pues, los homocigotos s^f/s^f tienen 80 unidades y sus células son cuadradas. Surge un alelo mutante (s^n), no funcional, que no contribuye con unidad alguna del factor.

a. ¿Cuál de los alelos, s^f o s^n, será dominante?

b. ¿Son necesariamente dominantes todos los alelos funcionales? Explique su respuesta.

c. En un sistema como el descrito, ¿cómo debería haber cambiado un alelo específico durante la evolución, para que su fenotipo mostrara ser recesivo en la generación 1 y dominante en generaciones posteriores?

***30.** Explique cómo fue capaz Benzer de calcular el número de sitios con cero hechos de mutación, según se indica en la Figura 9-27. (Asuma, tal como hizo Benzer, que los sitios con 0, 1 y 2 hechos de mutación tienen la misma probabilidad de mutar).

31. El color de los pétalos de *Collinsia parviflora* es normalmente púrpura. Se han identificado cuatro mutaciones recesivas que producen pétalos blancos. Las líneas puras para cada una de las mutaciones se cruzan en las combina-

ciones siguientes, obteniéndose los resultados que se indican:

Mutantes cruzados	F_1	F_2
1 × 2	todas púrpura	$\frac{1}{2}$ púrpura, $\frac{1}{2}$ blancas
1 × 3	todas púrpura	$\frac{9}{16}$ púrpura, $\frac{7}{16}$ blancas
1 × 4	todas blancas	todas blancas

a. Explique con claridad todos estos resultados, empleando esquemas cuando sea posible.

b. ¿Qué F_1 y F_2 predeciría para los cruzamientos 2 × 3 y 2 × 4?

*32. Un biólogo está interesado en el control genético de la síntesis de leucina en el hongo filamentoso haploide *Aspergillus*. Trata esporas con un mutágeno y obtiene cinco mutaciones puntuales (*a-e*) que provocan auxotrofía para leucina. Primero hace heterocariontes entre ellos para establecer relaciones funcionales. Los heterocariontes los siembra en medio sin leucina y obtiene los siguientes resultados («+» indica crecimiento del heterocarionte y «–» no crecimiento del heterocarionte):

	a	*b*	*c*	*d*	*e*
a	–	+	+	+	–
b		–	+	+	+
c			–	+	+
d				–	+
e					–

Posteriormente, el biólogo cruza entre sí las mutaciones, en todas las combinaciones posibles. Analiza 500 ascosporas de cada cruzamiento mediante siembra en medio sin leucina. Los resultados se muestran en la tabla siguiente, donde se indica el número de protótrofos para la leucina en los 500 descendientes:

	a	*b*	*c*	*d*	*e*
a	0	125	128	126	0
b		0	124	2	125
c			0	124	127
d				0	123
e					0

Explique genéticamente ambos conjuntos de datos. (Tenga en cuenta que los dos protótrofos para la leucina del cruzamiento *b* × *d* *no* se han originado por reversión).

33. En *Drosophila*, el fenotipo de ojo «en estrella» se debe a una mutación recesiva (*s*), situada en cierta región del segundo cromosoma. Esta región está flanqueada a la izquierda por el locus *A* (alelos *A* o *a*) y a la derecha por el locus *B* (alelos *B* o *b*):

A/a — *estrella* — *B/b*

Seis mutaciones *s* independientes se hacen homocigóticas, tanto en fondo genético *A B*/*A B* como *a b*/*a b*, y se cruzan entre sí para llevar a cabo el análisis de complementación del locus *estrella*. Los resultados se muestran en la tabla siguiente, en la que «+» indica ojo silvestre y «*s*» ojo mutante, siempre refiriéndonos a los fenotipos de la F_1.

	A s B/*A s B*					
a s b/*a s b*	1	2	3	4	5	6
1	s	+	s	s	+	[+]
2		s	+	[+]	s	+
3			s	s	+	+
4				s	+	+
5					s	+
6						s

a. ¿Cuántos genes contiene la región *estrella* y qué mutaciones afectan a cada gen?

b. Dejamos que los heterocigotos indicados con corchetes produzcan gametos. En ambos casos, identificamos los gametos recombinantes s^+ y los analizamos respecto de los marcadores adyacentes, que resultan ser *a B*, tanto en el caso del heterocigoto 1 × 6 como del heterocigoto 2 × 4. Ordene los genes con respecto a los loci *A/a* y *B/b*.

34. En 1934, en Noruega, una madre con dos hijos con retraso mental fue a la consulta del doctor Asbjørn Følling. En el transcurso del examen médico, Følling se dio cuenta de que la orina de los niños tenía un olor extraño. Posteriormente, analizó la orina con cloruro férrico y descubrió que, mientras que la orina normal adquiría un tono marrón, la orina de estos niños se teñía de verde. Dedujo que el compuesto responsable del color verde debía ser el ácido fenilpirúvico. Parecía probable, debido a la similitud estructural con la fenilalanina, que esta sustancia se había originado a partir de fenilalanina presente en la sangre; pero, en principio, no se podía probar, debido a que no existía un procedimiento analítico para detectarla. Para salvar este inconveniente, el doctor Følling utilizó una bacteria que es capaz de convertir la fenilalanina en ácido fenilpirúvico, de modo que el nivel de fenilalanina en sangre podía medirse usando el análisis del cloruro férrico. Así, demostró que los dos niños tenían niveles elevados de fenilalanina en la sangre y que, probablemente, era el origen del ácido fenilpirúvico. Følling también se percató que, en general, había una proporción de afectados de $\frac{1}{4}$ frente a $\frac{3}{4}$ de sanos en las familias con niños con retraso mental y cuya orina se teñía de verde con cloruro férrico. A la vista de estas proporciones, la enfermedad, que ha llegado a conocerse como fenilcetonuria, parecía tener una base genética con un patrón de herencia mendeliana simple, siendo recesivo el alelo responsable de la enfermedad.

Llegó a estar claro que la fenilalanina era la culpable y que este compuesto se acumulaba en grandes cantidades en los pacientes con fenilcetonuria. En estos pacientes se convertía en ácido fenilpirúvico, el cual interfería con el desarrollo normal del tejido nervioso. Este hallazgo permitió diseñar una dieta especial, baja en fenilalanina, con la que podía alimentarse a bebés recién nacidos diagnosticados

de fenilcetonuria, permitiéndoles continuar su desarrollo normal sin retraso. Además, se encontró que, una vez que el sistema nervioso del niño se había desarrollado, el paciente podía dejar la dieta especial. Sin embargo, desgraciadamente, las mujeres diagnosticadas de fenilcetonuria, pero que habían tenido un desarrollado normal gracias a la dieta, tenían hijos con retraso mental y en los que la dieta no tenía efecto alguno.

a. ¿Por qué cree que los hijos de madres con fenilcetonuria presentan retraso mental al nacer?

b. Explique la razón de la diferencia en los resultados obtenidos con los niños con fenilcetonuria y los de madres con fenilcetonuria.

c. Proponga un tratamiento que permita a las madres con fenilcetonuria tener hijos sanos.

d. Escriba un ensayo corto sobre la fenilcetonuria en el que se integren conceptos genéticos, de diagnóstico, enzimáticos, fisiológicos, de pedigrí y poblacionales.

El problema paso a paso

1. Dibuje un árbol genealógico de la familia noruega tan completo como pueda. ¿Cree que algunos hermanos podían no estar afectados?

2. Suponga que el niño que fue llevado al doctor Følling tenía 10 años, ¿podría haberse beneficiado de la dieta especial si hubiese empezado a tomarla?

3. ¿Por qué necesitó Følling una bacteria?

4. ¿Por qué se consideró importante un análisis de la sangre?

5. ¿Por qué aparecía ácido fenilpirúvico en la orina?

6. ¿Qué relación espera que haya entre las concentraciones en orina y en sangre?

7. ¿Tenía importancia en sí misma la sustancia verde originada en el análisis del cloruro férrico?

8. ¿Qué concentraciones de fenilalanina y ácido fenilpirúvico esperan encontrarse en la sangre y orina de niños sanos?

9. ¿Qué provocaba el olor en la orina de los niños afectados?

10. ¿Cuáles eran los genotipos de los padres?

11. ¿Serán frecuentes las familias con padres con estos genotipos?

12. ¿Qué genotipos se esperan en la descendencia y en qué proporciones?

13. ¿Cuáles serán los genotipos de los padres en la mayoría de las familias de la población?

14. ¿Por qué se infirió que la enfermedad era heredada?

15. ¿Por qué se infirió que se heredaba de forma mendeliana como un carácter recesivo?

16. ¿En que etapa(s) del desarrollo se desarrolla la mayor parte del sistema nervioso?

17. ¿Por qué se creía que los adultos con fenilcetonuria no necesitaban seguir la dieta especial?

18. ¿Cuáles son los volúmenes relativos de los sistemas de circulación sanguínea materna y fetal?

19. ¿Qué tipo de entidades son capaces de pasar la barrera placentaria (células, macromoléculas, moléculas pequeñas)?

20. ¿Qué sustancias asociadas con la fenilcetonuria podrían pasar del niño a la madre? ¿Y de la madre al niño?

21. ¿Qué es un aminoácido esencial?

22. ¿Es la fenilalanina un aminoácido esencial?

23. ¿Cómo ilustra la fenilcetonuria la hipótesis un gen-una enzima?

24. ¿Por qué es recesiva la fenilcetonuria?

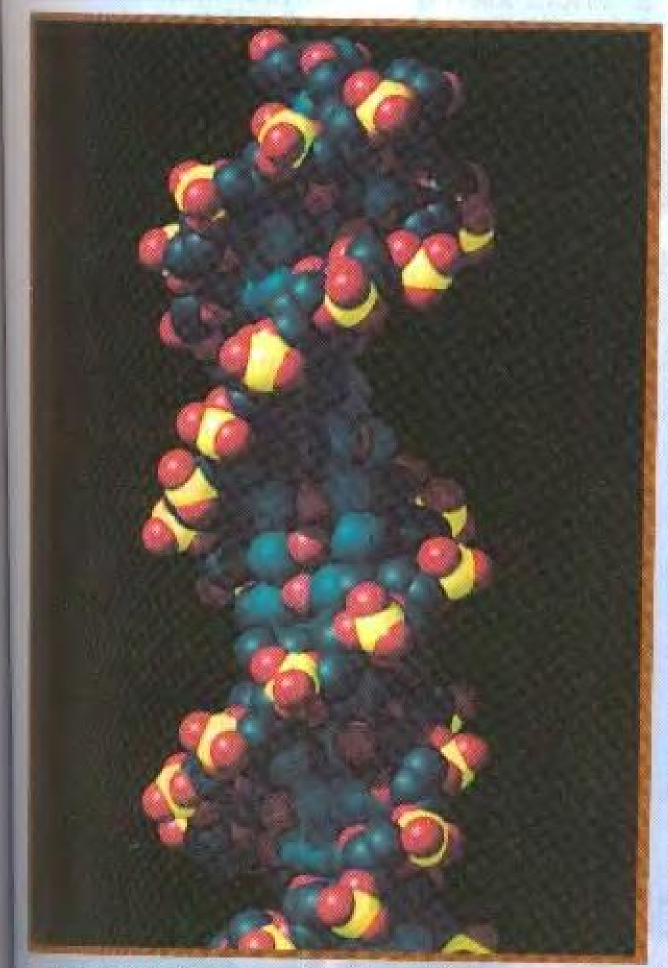
25. ¿Cuál es la relevancia de las rutas bioquímicas con relación a la fenilcetonuria?

26. Busque en este capítulo un gráfico que muestre la posición de los compuestos asociados a la fenilcetonuria en la química de la célula.

27. Dibuje un diagrama relacionando cromosoma, gen, sitio, mutación, mRNA, enzima, sustrato y producto, en individuos sanos y con fenilcetonuria.

10

BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA FUNCIÓN GÉNICA



Modelo simulado por ordenador de la molécula de DNA.
Nowlel, Computer Graphics Laborotory, University of California, San Fran Copyright © Regents, University of California.)

Ideas fundamentales

El DNA se transcribe en una molécula de mRNA, que posteriormente se traduce durante el proceso de síntesis proteica.

La traducción requiere moléculas de RNA transferentes y ribosomas.

El código genético consiste en un código de tripletes no solapados.

Existen secuencias específicas que marcan las posiciones donde debe comenzar y terminar la transcripción y la traducción.

En los eucariotas, el transcrito primario se procesa de diversas maneras antes de convertirse en mRNA.

Muchos genes eucarióticos contienen segmentos de DNA, denominados intrones, que interrumpen la secuencia informativa del gen.

Para eliminar los intrones y producir el mRNA final, el transcrito primario eucariótico sufre un proceso de corte y empalme.

El objetivo de este capítulo es analizar cómo la información genética se traduce en la aparición de macromoléculas funcionales. Los productos iniciales de todos los genes son los ácidos ribonucleicos (RNA). El RNA es similar al DNA, excepto que el azúcar en el RNA es la ribosa y el uracilo sustituye a la timina. El RNA se sintetiza mediante un proceso que copia la secuencia nucleotídica del DNA. Puesto que este proceso recuerda a la transcripción o copia de palabras escritas, el proceso de síntesis de RNA se conoce como **transcripción**, y el producto así obtenido se denomina **transcrito**. Veremos en este capítulo que uno de los primeros indicios sobre cómo el DNA dirige la síntesis de proteínas se obtuvo de experimentos realizados con bacteriófagos, a partir de los cuales se demostró que la expresión génica resultaba en la transcripción de moléculas de RNA a partir del DNA molde. La transcripción es catalizada por una enzima, la polimerasa de RNA, siguiendo unas normas muy similares a las que gobiernan la replicación.

Existen varias clases de RNA que analizaremos en este capítulo. Los *RNA informativos* son intermediarios en el proceso de descodificación de los genes a cadenas polipeptídicas. El RNA informativo a partir del cual se sintetizan directamente las proteínas es el **RNA mensajero (mRNA)**. En los procariotas, el transcrito, tal como es sintetizado a partir del DNA (el transcrito primario), es el mRNA. En los eucariotas, sin embargo, el transcrito primario sufre un procesamiento que consiste en la modificación de los extremos 5′ y 3′, y la eliminación de fragmentos (intrones) del transcrito primario. El resultado final de este procesamiento del pre-mRNA es el mRNA. Más adelante en este capítulo, analizaremos con más detalle estos pasos en la producción del mRNA. La secuencia de nucleótidos del mRNA se convierte en la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica por un proceso denominado **traducción**.

Los *RNA funcionales* nunca se traducen en polipéptidos. Ejercen su acción en forma de RNA y desempeñan varias funciones diferentes. En todos los organismos se han encontrado dos clases. Las moléculas de **RNA transferente (tRNA)** transportan los aminoácidos al mRNA durante la síntesis proteica. Los tRNA son componentes generales de la maquinaria de traducción. Los **RNA ribosómicos (rRNA)** se asocian a un conjunto de proteínas diferentes para formar los ribosomas, que son las «máquinas» encargadas de la síntesis proteica. Existen otras dos clases de RNA funcionales que están implicados en el procesamiento de la información y son específicos de eucariotas. Los **RNA nucleares pequeños (snRNA)** participan en el procesamiento en el núcleo de los transcritos primarios a RNA mensajeros. Varias proteínas específicas se combinan con los snRNA y forman pequeñas partículas ribonucleoproteicas (**snRNP**) que sirven de «plataforma» para las reacciones de corte y empalme. Los **RNA citoplásmicos pequeños (scRNA)** están involucrados en el transporte de proteínas dentro de las células eucarióticas. En concreto, se encargan de asegurar que polipéptidos destinados, por ejemplo, a ser secretados, se inserten en el compartimiento celular adecuado (el retículo endoplásmico rugoso). Así comienza el proceso de secreción proteica.

Cualquier función del DNA y del RNA se basa en dos principios fundamentales:

1. Las bases complementarias de las cadenas nucleotídicas individuales pueden establecer puentes de hidrógeno y form así estructuras de cadena doble.
2. Secuencias nucleotídicas concretas de los ácidos nucle de cadena sencilla y doble pueden ser reconocidas por pr teínas específicas que se unen a los ácidos nucleicos. En l siguientes apartados puede verse aplicado este principi

Propiedades del RNA

Aunque tanto el RNA como el DNA son ácidos nucleicos RNA difiere en varios aspectos fundamentales:

1. El RNA suele estar constituido por una sola cadena de n cleótidos, no es una hélice doble. Como consecuenci, RNA puede adoptar una gama mucho mayor de estructur tridimensionales complejas que el DNA de cadena dob Consideraremos esta propiedad con más detalle poster mente en este capítulo.
2. El RNA tiene el azúcar **ribosa** en sus nucleótidos, en ve una desoxirribosa. Como sus nombres indican, los dos a cares difieren en la presencia o ausencia de un átomo oxígeno. Igual que las cadenas individuales del DNA, RNA presenta un esqueleto de fosfato-ribosa, en el que c base se une covalentemente a la posición 1′ de cada ribo

Ribosa — Desoxirribosa

3. Los nucleótidos del RNA pueden tener las bases aden guanina y citosina, pero la base pirimidínica **uracilo** sustituye a la timina. No obstante, el uracilo establece pu tes de hidrógeno con la adenina, igual que lo hace la tim

Uracilo

Transcripción

Los primeros investigadores del tema tenían motivos justi dos para pensar que la información no se transfiere directam del DNA a las proteínas. En una célula eucariótica, el DN encuentra en el núcleo, mientras que las proteínas se sinte en el citoplasma. La necesidad de un intermediario es obv



Figura 10-1. El RNA sintetizado durante un breve período de tiempo se marca, suministrando a la célula un «pulso» de precursores radiactivos del RNA, seguido de una «caza» con precursores no radiactivos. En una autorradiografía, el RNA marcado aparece como granos oscuros. Los resultados sugieren que el RNA se sintetiza en el núcleo y luego se transporta al citoplasma.

Experimentos pioneros que sugirieron la existencia de un RNA intermediario

Si se suministran precursores radioactivos a las células, donde primero se observa el RNA es en el núcleo, lo que indica que es allí donde se sintetiza el RNA. En un experimento de **pulso y caza**, los precursores del RNA marcados se suministran en forma de un pulso breve. Una vez que estos precursores se han incorporado al RNA, las células se transfieren a un medio con precursores no marcados. De este modo se puede «cazar o perseguir» la marca incorporada en el RNA, ya que a medida que este RNA se degrada, la síntesis de nuevas moléculas de RNA ocurre a partir de los precursores no marcados. Los experimentos de pulso y caza nos permiten seguir la evolución temporal de una población de moléculas de RNA que han sido sintetizadas casi simultáneamente. En muestras tomadas después de la caza, el RNA marcado se encuentra en el citoplasma (Fig. 10-1). Parece, entonces, que el RNA se sintetiza en el núcleo y se traslada posteriormente al citoplasma, donde se sintetizan las proteínas. Por ello, el RNA es un buen candidato a servir de intermediario en la transferencia de información entre el DNA y las proteínas.

En 1957, Elliot Volkin y Lawrence Astrachan realizaron una observación significativa. Encontraron que uno de los cambios moleculares más sorprendentes que ocurren cuando *E. coli* es infectada con el fago T2 es un aumento repentino en la síntesis de RNA. Además, el RNA cuya síntesis se induce por el fago tiene una vida media muy corta, como se demuestra en el siguiente experimento. Primero, las bacterias infectadas se someten a un pulso con uracilo radiactivo (un precursor específico del RNA); luego, las bacterias se someten a una caza con uracilo no marcado. El RNA recuperado poco después del pulso se encuentra marcado, pero el recuperado algo después de la caza no está marcado, lo que indica que el RNA tiene una vida media muy corta. Finalmente, cuando se compara el contenido nucleotídico del RNA inducido por el fago se observa que este RNA es muy parecido al DNA del fago.

La conclusión más tentativa de los dos experimentos descritos es que el RNA se sintetiza a partir del DNA y, de algún modo, se utiliza para sintetizar proteínas. Podemos ahora definir tres etapas en el flujo de información (Fig. 10-2): *replicación* (la síntesis de DNA), *transcripción* (la copia a RNA de una parte del DNA) y *traducción* (la síntesis de un polipéptido dictada por la secuencia del RNA).

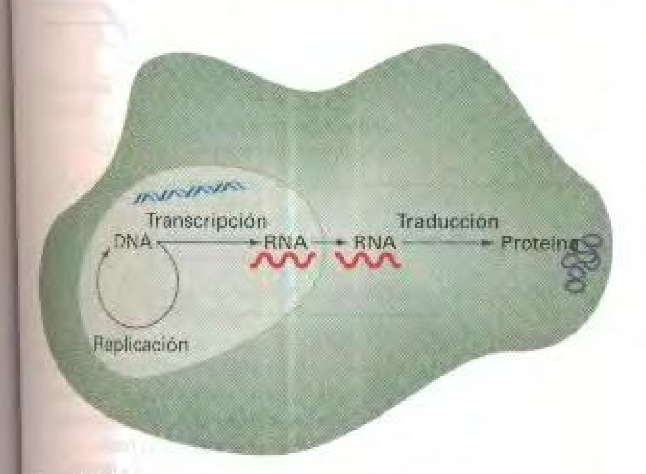


Figura 10-2. Los tres procesos de flujo de información: replicación, transcripción y traducción.

Complementariedad y asimetría en la síntesis de RNA

El parecido entre el RNA y el DNA sugería que la transcripción podría estar basada en la complementariedad entre bases, en la que también se fundamenta la replicación del DNA. La enzima

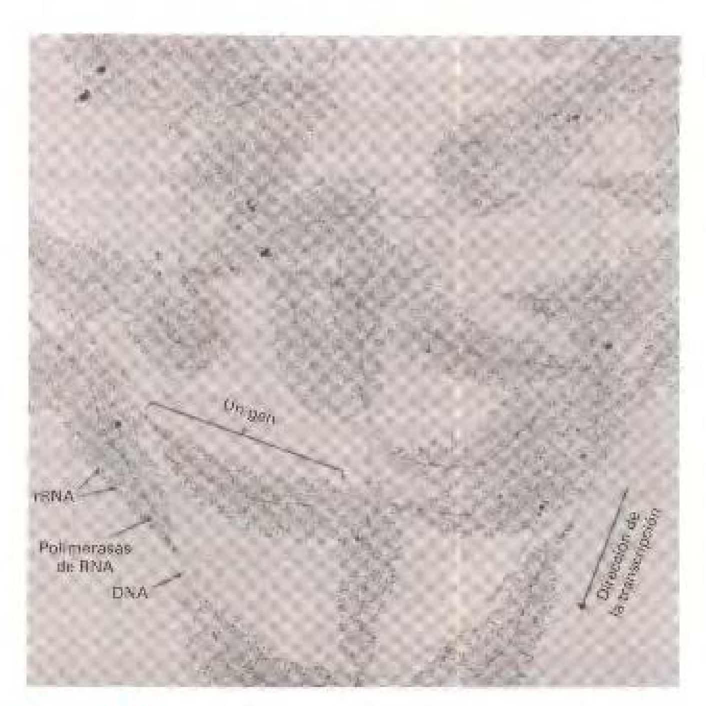


Figura 10-3. Transcripción en el nucléolo de *Triturus viridiscens* (un anfibio) de los genes repetidos en tándem que determinan el RNA ribosómico (rRNA). (El rRNA es un componente del ribosoma). A lo largo de cada gen se encuentran unidas muchas moléculas de polimerasa de RNA transcribiendo en una dirección. Las moléculas de RNA en crecimiento tienen aspecto de fibras que emanan del esqueleto de DNA. Las moléculas de RNA más cortas se encuentran más cerca del sitio de inicio de la transcripción; las más largas casi han completado el proceso. De ahí, el aspecto de «árbol de Navidad». (Fotografía de O. L. Miller Jr. y Barbara A. Hamkalo.)

encargada de la transcripción, la polimerasa de RNA, podría realizar la transcripción a partir de la cadena molde de forma bastante similar a como se lleva a cabo la replicación.

De hecho, este modelo para la transcripción puede confirmarse citológicamente (Fig. 10-3). También se demuestra que la síntesis del RNA utiliza el DNA como molde, ya que, en presencia de DNA y polimerasa de RNA purificada, puede producirse RNA *in vitro* a partir de nucleótidos. Cualquiera que sea la fuente de DNA utilizada, el RNA sintetizado presenta una relación (A + U)/(G + C) similar a la relación (A + T)/(G + C) del DNA (Cuadro 10-1). Este experimento no indica si el RNA se sintetiza a partir de ambas cadenas o sólo de una, pero refleja que la frecuencia lineal de los pares A—T (en comparación con los pares G—C) en el DNA se corresponde con la abundancia relativa de (A + U) en el RNA. (Estas nociones pueden resultar difíciles de captar sin la ayuda de esquemas; el problema 2 de este capítulo debería ayudar a su comprensión).

Para comprobar si existe complementariedad entre el DNA y el RNA, los investigadores pueden hacer uso de la especificidad y precisión de la hibridación entre ácidos nucleicos. El DNA se desnaturaliza y se mezcla con el RNA sintetizado en su presencia. Cuando la preparación se enfría lentamente, algunas de las cadenas de RNA se asocian con el DNA complementario dando lugar a un híbrido DNA-RNA. El híbrido DNA-RNA tiene una densidad diferente a la de la doble hélice DNA-DNA, por lo que su presencia puede detectarse por ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio (CsCl). Los ácidos nucleicos sólo se asocian si existen tramos suficientemente largos de complementariedad entre las bases, de manera que la aparición de un híbrido DNA-RNA demuestra que la secuencia del transcrito es complementaria a la del DNA parental.

¿Es posible determinar si el RNA se sintetiza a partir de una sola o de ambas cadenas del DNA? Parece razonable que se utilice una sola cadena, porque la transcripción de ambas cadenas produciría dos moléculas de RNA complementarias a partir del mismo tramo de DNA, y dos proteínas diferentes (con secuencias aminoacídicas distintas). De hecho, existen una variedad de pruebas químicas que demuestran que la transcripción suele utilizar una sola de las cadenas de DNA (aunque no necesariamente la misma cadena a lo largo de todo el cromosoma).

Los experimentos de hibridación también nos permiten contestar a dicha pregunta. Si las dos cadenas presentan una relación purinas:pirimidinas suficientemente diferente, pueden separarse en un gradiente de cloruro de cesio porque tienen densidades distintas. El RNA sintetizado a partir de un tramo de DNA puede ser purificado y mezclado por separado con cada una de las cadenas para determinar si es complementario a una sola de las cadenas. J. Marmur y colaboradores separaron las cadenas de DNA del fago SP8 de *Bacillus subtilis* de la siguiente manera: Desnaturalizaron el DNA, lo enfriaron rápidamente para impedir la reasociación y separaron las cadenas en CsCl. Así, demostraron que el RNA de SP8 hibrida con una sola de las cadenas y que, por consiguiente, la transcripción es **asimétrica**, es decir, ocurre a partir de una sola de las cadenas.

Aunque, para cada gen, el RNA se transcribe a partir de una sola cadena, la misma cadena no se utiliza necesariamente como molde a lo largo de todo el cromosoma o en las diferentes etapas del ciclo de vida. El RNA sintetizado en diferentes momentos del ciclo de infección de un fago hibrida con diferentes segmentos del cromosoma, indicando que hay una expresión diferencial de genes a lo largo del ciclo (Fig. 10-4). En el fago λ, cada una de las cadenas de DNA se transcribe parcialmente en diferentes momentos del ciclo. En el fago T7, sin embargo, la misma cadena se utiliza para transcribir los genes tempranos y tardíos. La Figura 10-5 muestra una secuencia de RNA sintetizada a partir

CUADRO 10-1. Proporción de nucleótidos de distintos DNA y de sus transcritos (*in vitro*)

Origen del DNA	$\frac{(A+T)}{(G+C)}$ del DNA	$\frac{(A+U)}{(G+C)}$ del RNA
Fago T2	1.84	1.86
Vaca	1.35	1.40
Micrococcus (bacteria)	0.39	0.49

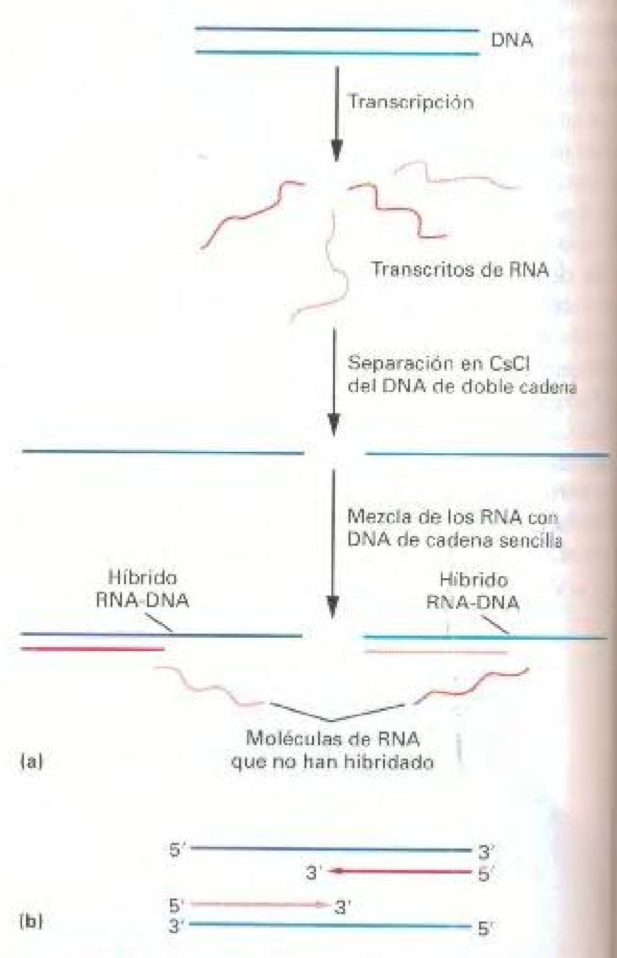


Figura 10-4. (a) Los experimentos de hibridación DNA-RNA demuestran que cada transcrito de RNA es complementario a sólo una de las dos cadenas del DNA parental. En este ejemplo, ambas cadenas de DNA se transcriben, pero la transcripción es asimétrica, es decir, en una región concreta sólo se transcribe una de las cadenas. (b) Mapa de este genoma hipotético que muestra la dirección de la transcripción de los dos transcritos de cadenas opuestas de DNA.



Figura 10-5. La secuencia de mRNA es complementaria a la cadena molde del DNA utilizada para su síntesis. La secuencia que se muestra aquí procede del gen que determina la enzima β-galactosidasa, implicada en el metabolismo de la lactosa.

de la cadena molde de DNA. La cadena de DNA que se transcribe para un mRNA dado se denomina **cadena molde**. La cadena complementaria de DNA es la **cadena sin sentido**. Observe que la secuencia del mRNA coincide con la secuencia de la cadena sin sentido (excepto que U sustituye a T).

Transcripción y polimerasa de RNA

Como se comentó anteriormente, la transcripción depende de la complementariedad entre las bases. Se produce una separación local de las dos cadenas del DNA, y una de las cadenas separadas actúa como guía para la síntesis de RNA. A continuación, nucleótidos libres se emparejan con el DNA molde, «atraídos» por las bases complementarias en el mismo. El nucleótido libre A empareja con una T en el DNA, G con C, C con G, y U con A. Este proceso está catalizado por **la polimerasa de RNA**, que se une al DNA y se mueve a lo largo de la molécula añadiendo ribonucleótidos al RNA en crecimiento como se muestra en la Figura 10-6*a*. Vemos así los dos principios básicos en acción: la complementariedad entre bases y la unión de proteínas a los ácidos nucleicos (en este caso, la polimerasa de RNA).

El crecimiento del RNA se produce siempre en la dirección 5' → 3'; en otras palabras, los nucleótidos siempre se añaden a un extremo 3' creciente, como se ilustra en la Figura 10-6*b*. Debido a la naturaleza antiparalela del emparejamiento entre nucleótidos, que el RNA se sintetice en la dirección 5' → 3' significa que la cadena molde debe estar orientada en la dirección contraria 3' → 5'.

Polimerasa de RNA

En la mayoría de los procariotas, una sola polimerasa de RNA transcribe todos los tipos de RNA. La Figura 10-7 muestra la

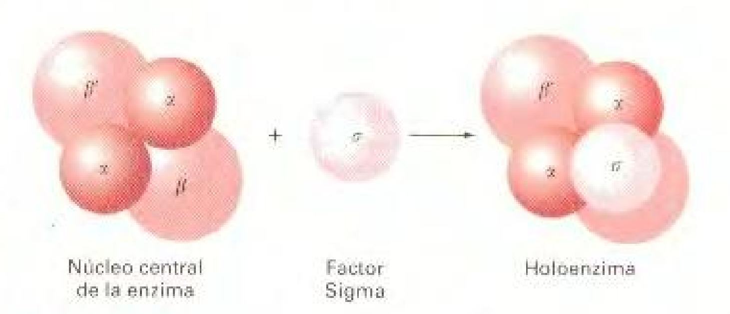


Figura 10-7. Estructura de la polimerasa de RNA. El núcleo central de la enzima contiene dos polipéptidos α, un polipéptido β y un polipéptido β'. La unión de la subunidad σ al núcleo central de la enzima permite la iniciación específica de la transcripción en las regiones promotoras.

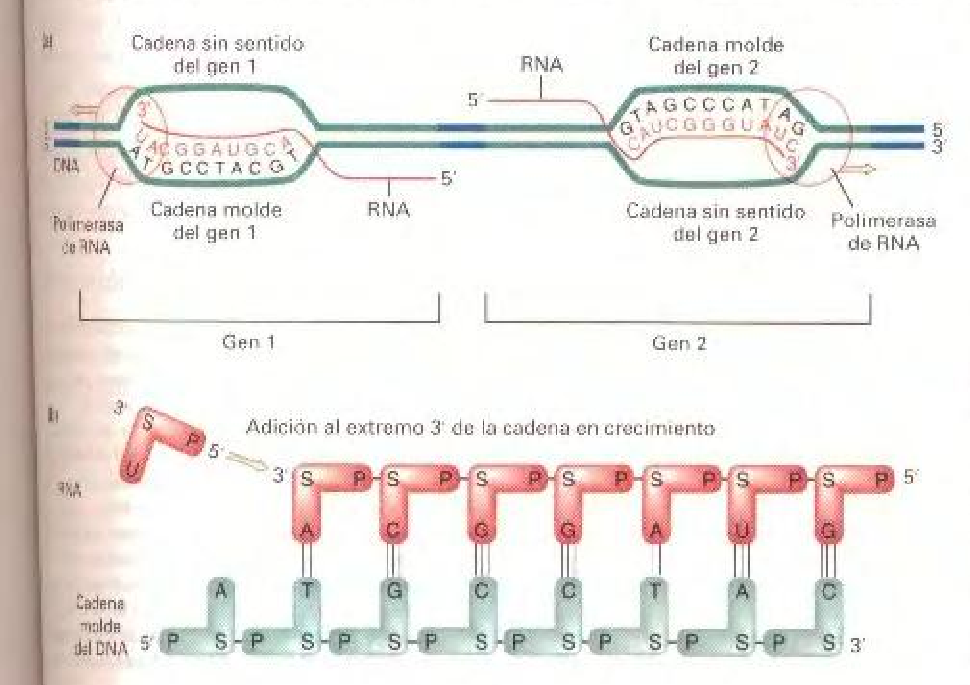
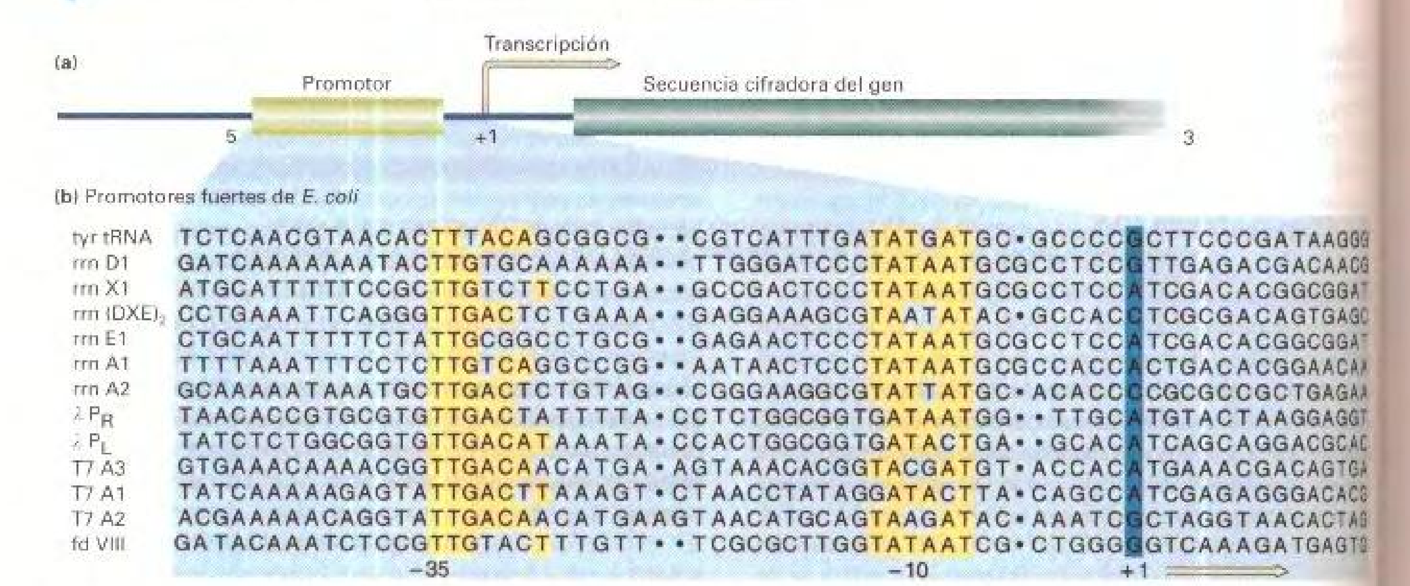


Figura 10-6. Transcripción de dos genes. (a) La polimerasa de RNA se mueve desde el extremo 3' de la cadena molde, generando una cadena de RNA que crece en la dirección 5' → 3' (ya que debe ser antiparalela a la cadena molde). Observe que algunos genes se transcriben a partir de una cadena del DNA y otros a partir de la cadena complementaria. (b) Se está añadiendo un uracilo al extremo 3' del transcrito del gen 1, así que crece en la dirección 5' → 3'.



(c) Secuencias consenso de todos los promotores de *E. coli*

región −35 **TTG**ACAT — 15–17 pb — región −10 **TA**TAAT

Figura 10-8. Secuencia promotora. (a) El promotor está situado «aguas arriba» (hacia el extremo 5') del sitio de inicio y de las secuencias cifradoras. (b) Los promotores contienen regiones con secuencias similares, que aparecen sombreadas en amarillo en los 13 promotores de *E. coli* mostrados. Los espacios (indicados con puntos) se introducen para potenciar la homología en las secuencias consenso. A la izquierda se indica el gen controlado por cada promotor. La numeración se asigna considerando el número de bases anteriores (−) o posteriores (+) al sitio de inicio de la transcripción. (c) El código de color utilizado en las secuencias consenso deducidas a partir de *todos* los promotores de *E. coli* es: letras azules, >75 %; letras negras en negrita, 50-75 %; letras negras, 40-50 %. [Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc. Véase W. R. McClure, *Ann. Rev. Biochem.* 54, 1985, 171 (Consensus Sequences).]

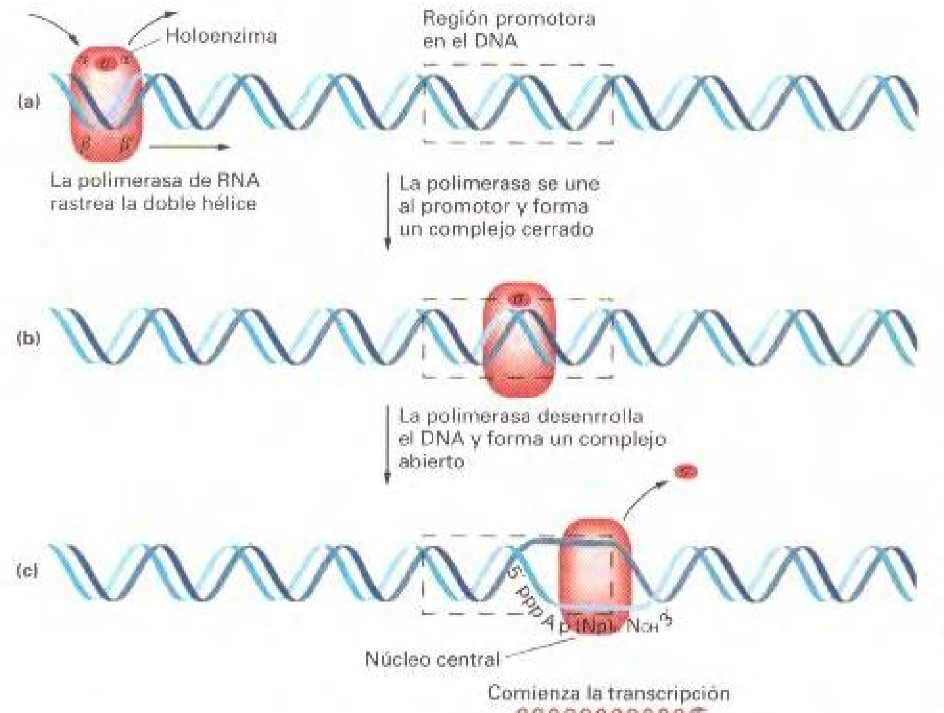


Figura 10-9. Iniciación de la transcripción. (a) La polimerasa de RNA busca un sitio promotor. (b) La enzima reconoce un sitio promotor y se une a él fuertemente, formando un complejo cerrado. (c) La holoenzima desenrolla una pequeña región de DNA, formando el complejo abierto. La transcripción comienza y se libera el factor σ. Se muestra el transcrito de RNA, comenzando con trifosfato de adenosina (pppA) y terminando en N_{OH} tras la incorporación de un número indeterminado de nucleótidos [(Np)n]. (Tomado de J. Darnell, H. Lodish, y D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, 2d ed. Copyright © 1990 de Scientific American Books, Inc.)

estructura de la polimerasa de RNA de *E. coli*. Podemos ver que la enzima está compuesta por cuatro subunidades diferentes. La subunidad beta (β) tiene un peso molecular de 150 000, la beta prima (β') de 160 000, la alfa (α) de 40 000 y la sigma (σ) de 70 000. La subunidad σ puede disociarse del resto del complejo, dejando el **núcleo central de la enzima**. La enzima completa con la subunidad σ es la RNA polimerasa en su forma de **holoenzima** y es necesaria para que la transcripción se inicie correctamente; una vez iniciado el proceso, el núcleo central de la enzima continúa con la transcripción.

Analicemos las tres fases de la transcripción: **iniciación**, **elongación** y **terminación**.

Iniciación

Las secuencias a las que se une la polimerasa de RNA para iniciar la transcripción se denominan **promotores**. (En el Cap. 11 analizaremos su papel en la regulación génica). La Figura 10-8 muestra las secuencias promotoras correspondientes a 13 sitios de inicio de la transcripción del genoma de *E. coli*. Las bases están alineadas por homología o similitud en la secuencia que aparece justo antes de la primera base transcrita (designado como «sitio de iniciación» en la Fig. 10-8).

Cabe señalar que en la Figura 10-8 aparecen dos regiones con similitud parcial en prácticamente todos los casos. Estas regiones se conocen como regiones −35 y −10 debido a su posición respecto al sitio de inicio de la transcripción. En la parte inferior de la Figura 10-8 se muestra la secuencia promotora consenso o ideal. Se ha demostrado que la polimerasa contacta con estas dos regiones cuando se une al DNA. La enzima desenrolla entonces la doble hélice y comienza la síntesis de una molécula de RNA.

La subunidad disociable de la polimerasa de RNA, el factor σ, es responsable de que la polimerasa de RNA reconozca y se una específicamente a las regiones promotoras. En primer lugar, la holoenzima explora el DNA en busca del promotor (Fig. 10-9*a*); una vez reconocidas las secuencias −35 y −10, se une a ellas débilmente. La estructura resultante se conoce como el *complejo cerrado* con el promotor (Fig. 10-9*b*). A continuación, la enzima se une más fuertemente y desenrrolla las bases cercanas a la región −10. Cuando la polimerasa unida provoca esta desnaturalización local de la doble hélice se dice que forma el *complejo abierto* con el promotor (Fig. 10-9*c*). Para esta etapa de iniciación se requiere la subunidad sigma.

Elongación

Poco después de la iniciación de la transcripción, el factor sigma se disocia de la polimerasa de RNA. El RNA se sintetiza siempre en la dirección 5′ → 3′ (Figs. 10-10 y 10-11), a partir de

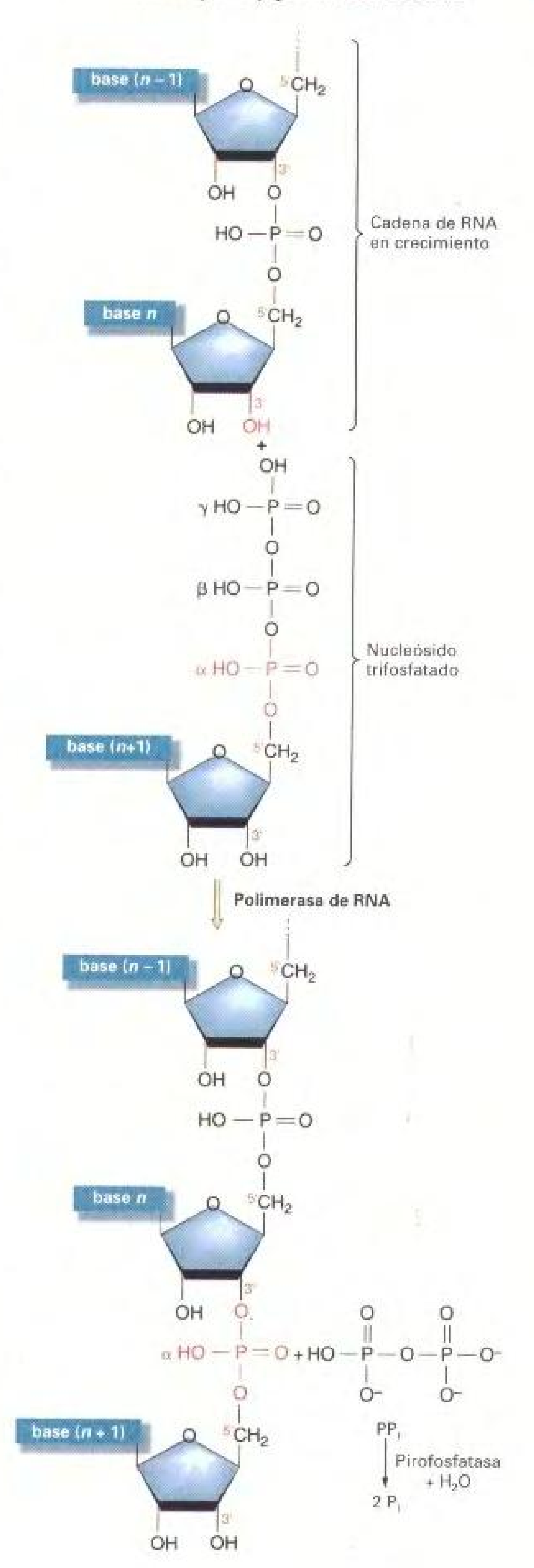


Figura 10-10. La incorporación secuencial de los nucleótidos ocurre [illegible], en dirección 5′ a 3′. La cadena crece por formación de un enlace entre [illegible] 3′ hidroxilo de la cadena en crecimiento y un nucleósido trifosfato, [illegible] una molécula de pirofosfato (PPi). Esto conduce a la adición [illegible] fosfato, que se incorpora al esqueleto de la nueva cadena. El DNA [illegible] con desoxirribonucleósidos trifosfatados, mientras que el RNA lo [illegible] con ribonucleósidos trifosfatados. (Tomado de H. Lodish y [illegible], A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, y J. Darnell, *Molecular [illegible]*, 3ª ed. Copyright © 1995, de Scientific American Books, Inc.).

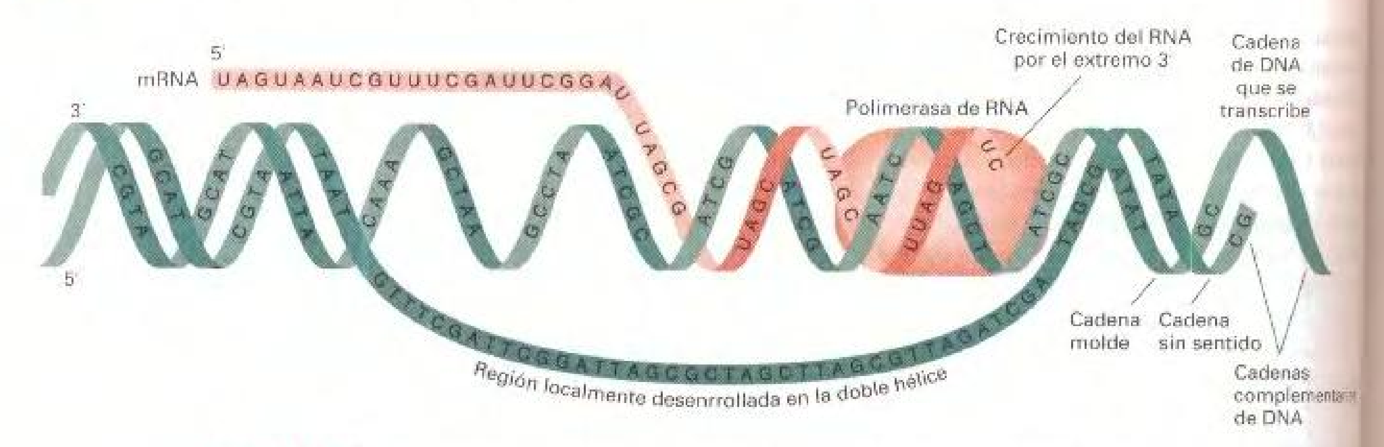


Figura 10-11. Transcripción mediada por la polimerasa de RNA. Se está sintetizando una cadena de RNA, en la dirección 5' → 3', a partir de una región localmente abierta en el DNA. (Tomado de E. J. Gardner, M. J. Simmons, y D. P. Snustad. *Principles of Genetics*, 8.ª ed. Copyright © 1991 de John Wiley and Sons, Inc.).

ribonucleósidos trifosfatados libres (NTP) que sirven de sustrato a la enzima. La siguiente ecuación representa la adición de cada ribonucleótido.

$$\text{NTP} + (\text{NMP})_n \xrightarrow[\substack{\text{RNA} \\ \text{polimerasa}}]{\substack{\text{DNA} \\ Mg^{2+}}} (\text{NMP})_{n+1} + \text{PP}_i$$

La energía necesaria para la reacción proviene de la ruptura del enlace trifosfato de alta energía para dar lugar a monofosfato y difosfato inorgánico (PPi), como se indica en la Figura 10-10. La Figura 10-11 ilustra el proceso de elongación. Debido a que la polimerasa de RNA se mueve a lo largo de una dóble hélice es necesario que se genere una «burbuja de transcripción», que va desplazándose a lo largo de la molécula de DNA durante la elongación. Hay determinadas secuencias que pueden provocar una pausa en el movimiento de la polimerasa, algo crucial para que se produzca la terminación de la transcripción.

Terminación

Cuando la polimerasa de RNA reconoce secuencias específicas en el DNA que actúan como señales de terminación de la transcripción, la cadena de RNA en crecimiento y la polimerasa se disocian del molde de DNA. *E. coli* dispone de dos mecanismos principales de terminación.

En el primero de estos mecanismos, la terminación es directa. Las secuencias terminadoras corresponden a unos 40 pb, que finalizan en un tramo rico en GC seguido por una serie de 6 o más A en la cadena molde. Las secuencias GC correspondientes del RNA se disponen de modo que el transcrito establece enlaces complementarios *consigo mismo* en esa región, como se representa en la Figura 10-12. La región de RNA de cadena doble resultante, denominada **lazo en horquilla**, va seguida de un trecho de residuos U (residuos A en el DNA molde). El lazo en horquilla y el trecho de residuos U parece que actúan como señal para la disociación de la polimerasa de RNA y la terminación de la transcripción.

En el segundo tipo, se requiere la ayuda de un factor proteico adicional denominado **rho** para que la polimerasa de RNA reco-

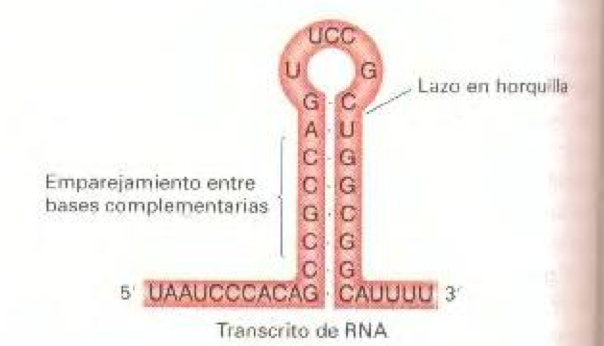


Figura 10-12. Estructura de un sitio de terminación de la transcrip[ción] bacteriana. La estructura en horquilla se forma debido a la complementari[edad] entre las bases de la *propia* cadena de RNA.

nozca las señales de terminación. Los mRNA que presentan [se]ñales de terminación dependientes de rho no presentan el tre[cho] de residuos U al final del RNA y, normalmente, tampoco pres[en]tan el lazo en horquilla. En la Figura 10-13 se muestra un mo[de]lo para la terminación dependiente de rho. Rho es un hexám[ero] compuesto por seis subunidades idénticas; la hidrólisis de A[TP a] ADP y P_i dirige la reacción de terminación. El primer paso [de la] terminación es la unión de rho a un sitio específico en el R[NA] denominado *rut* (Fig. 10-13*a* y *b*). Después de la unión, [rho] «arranca» el RNA de la polimerasa de RNA, probablem[ente] translocándose a lo largo del mRNA, como se ilustra en la Fi[gu]ra 10-13*b* y *c*. Los sitios *rut* están localizados justo aguas a[rriba] (es decir, en dirección 5') de las secuencias donde la polime[rasa] de RNA tiende a detenerse.

La eficacia de ambos mecanismos de terminación depen[de de] las secuencias circundantes y de otros factores proteicos.

RNA eucariótico

Hay varios aspectos que distinguen la síntesis de RNA y su [pro]cesamiento en los eucariotas respecto a los procariotas.

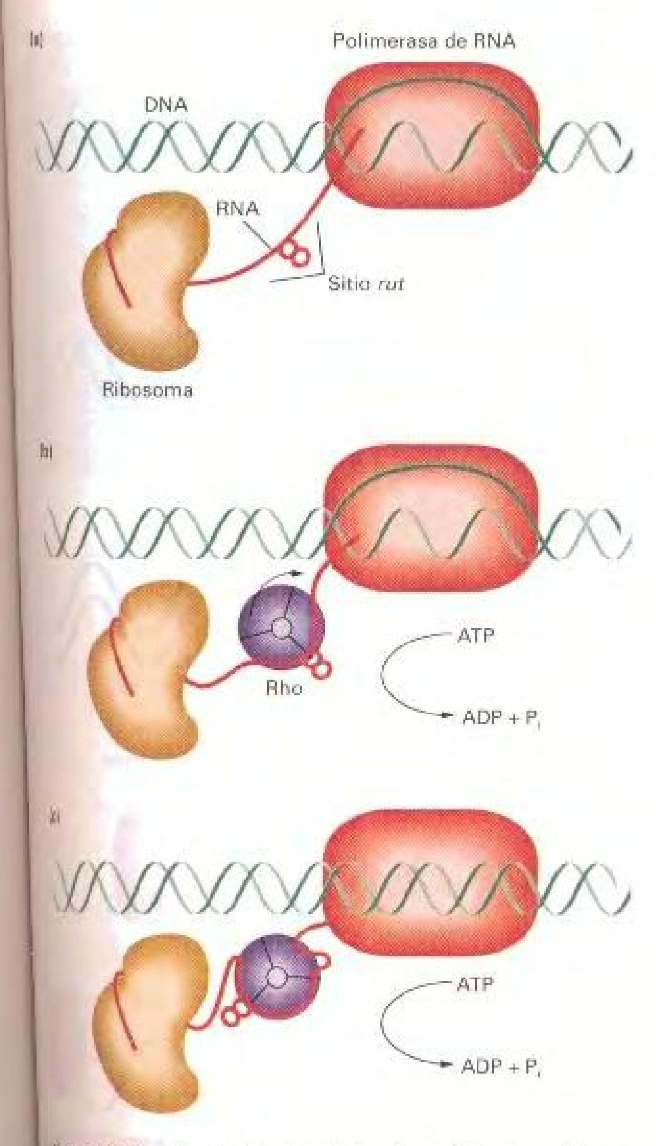


Figura 10-13. Modelo de acción de rho sobre un RNA en crecimiento [illegible] siendo simultáneamente traducido. (Tomado de J. P. Richardson, [illegible] 1991, 1047-1049.)

Síntesis de RNA

Mientras que hay una sola polimerasa de RNA que sintetiza todos los RNA en procariotas, los eucariotas tienen tres polimerasas de RNA diferentes:

1. La polimerasa de RNA I sintetiza rRNA.
2. La polimerasa de RNA **II** sintetiza mRNA. En eucariotas, las moléculas de mRNA siempre determinan la síntesis de una sola proteína, mientras que en procariotas hay muchos mRNA que contienen información para la síntesis de varias proteínas.
3. La polimerasa de RNA III transcribe los tRNA, así como moléculas de RNA nucleares y celulares de pequeño tamaño.

Las polimerasas eucarióticas son mucho más complejas que las polimerasas procarióticas. Algunas de sus subunidades son similares a las proteínas de *E. coli* correspondientes, pero otras no.

Procesamiento de RNA

El producto inicial de la transcripción, el transcrito de RNA primario, se procesa de diversas maneras antes de ser transportado al citosol, donde es utilizado por la maquinaria de traducción (Fig. 10-14). La Figura 10-15 ilustra con detalle los pasos del procesamiento. En primer lugar, durante la transcripción, se añade una **caperuza** constituida por un residuo 7-metilguanosina al extremo 5′ del transcrito, mediante el establecimiento de un enlace trifosfato. A continuación, se añade una cola de adeninas al extremo 3′ del transcrito. La longitud de estas **colas de poli (A)** es de unos 150 a 200 residuos. Una vez que se han llevado a cabo estas modificaciones, un paso de **maduración** elimina partes internas del transcrito. El descubrimiento de este proceso, del que se deriva que los genes están «fragmentados» y que su región informativa está interrumpida por secuencias internas, constituye uno de los hallazgos más importantes de la Genética molecular en los últimos 25 años.

Genes fragmentados

Los estudios con transcritos sintetizados a partir de DNA de virus de mamíferos indicaron por primera vez una falta de correspondencia entre el DNA viral y las moléculas de mRNA. Cuando la tecnología del DNA recombinante (véase el Cap. 12) facilitó el análisis físico de los genes eucarióticos se hizo patente que los transcritos *primarios* se acortaban mediante la elimina-

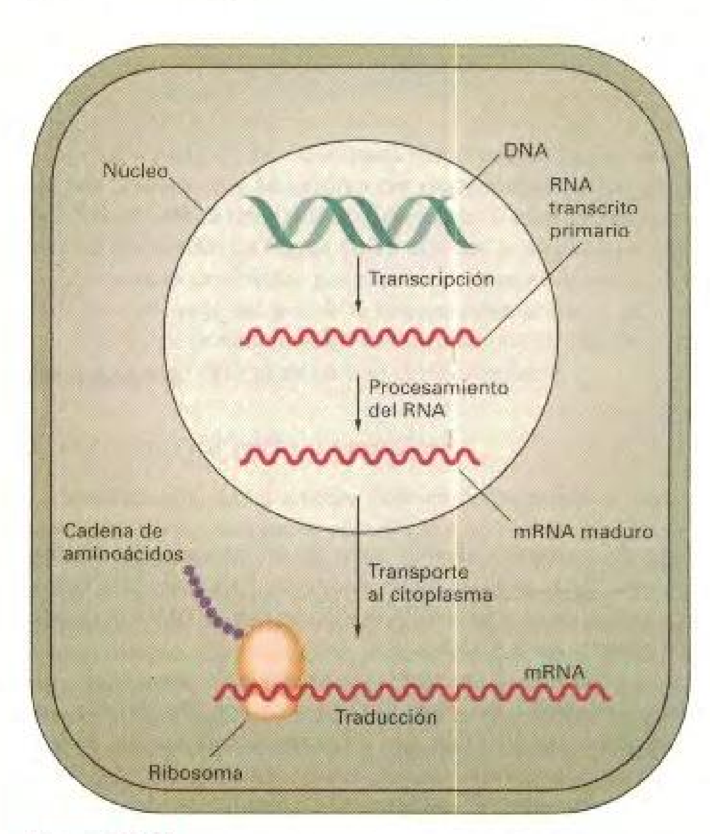


Figura 10-14. Expresión génica en eucariotas. El mRNA se procesa en el núcleo antes de ser transportado al citoplasma. (Tomado de J. E. Darnell, Jr., «The Processing of RNA». Copyright © 1983 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

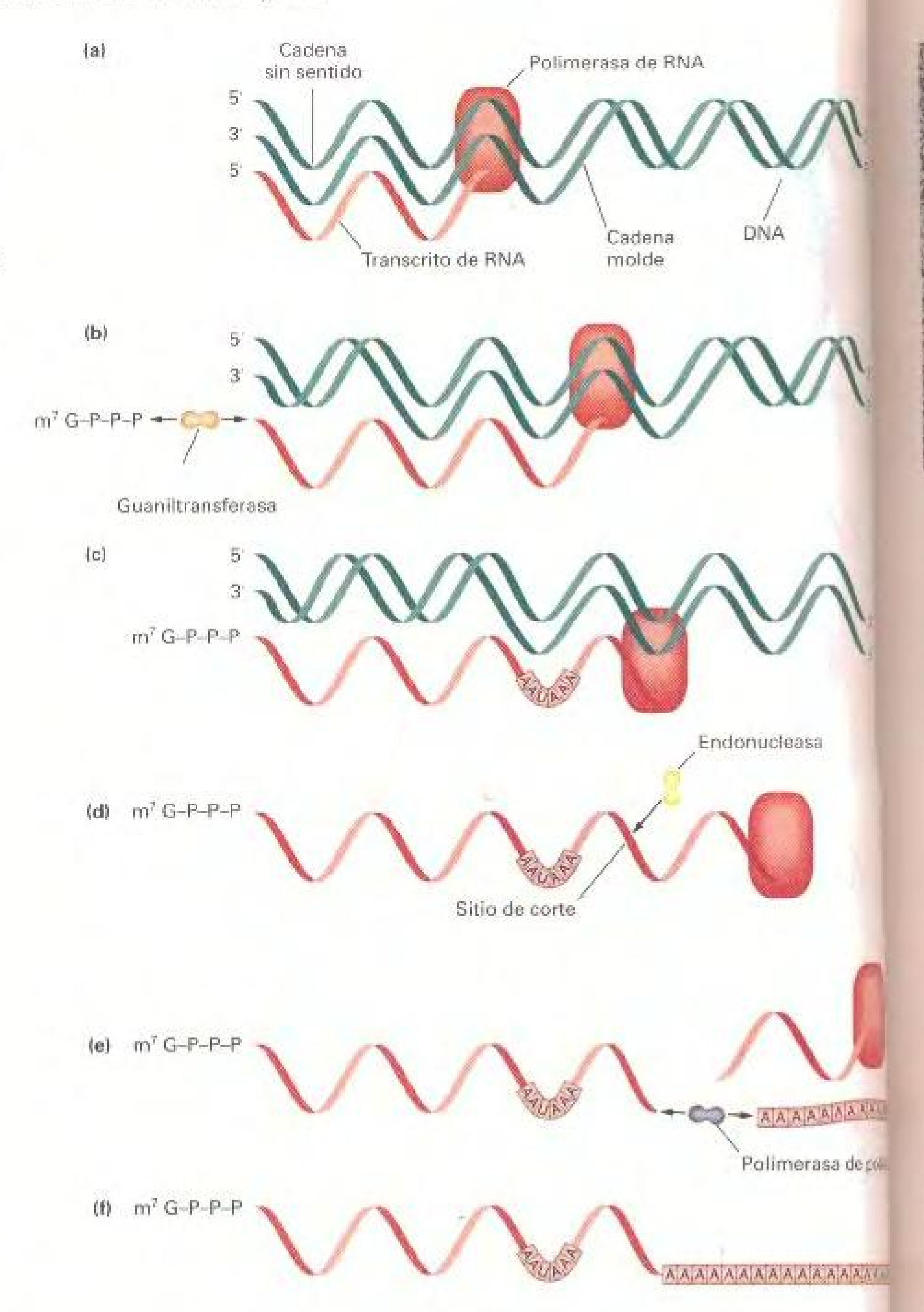
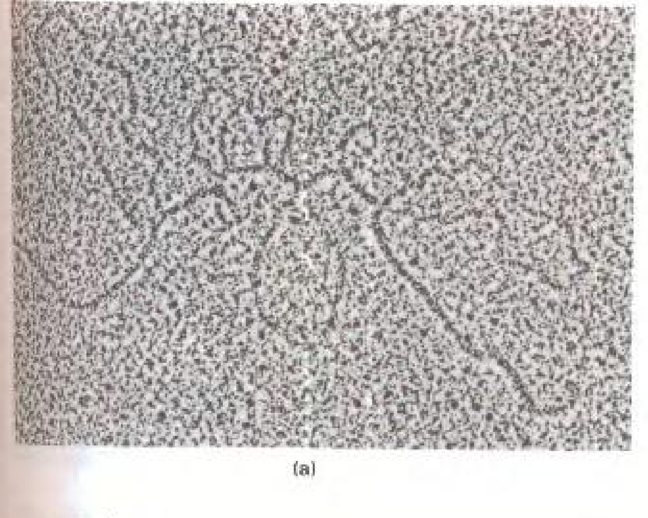


Figura 10-15. Procesamiento de un transcrito primario. (a) La transcripción está mediada por la polimerasa de RNA. (b) Poco después del inicio de la transcripción, la enzima guaniltransferasa añade 7-metilguanosina (m^7Gppp) al extremo 5' del mRNA. (c) La secuencia AAUAAA, cerca del extremo 3', actúa como señal para que ocurra (d) una reacción de corte unas 20 pb aguas abajo catalizada por una endonucleasa. (e) Entonces, la enzima polimerasa de poli(A) añade una cola de poli(A), compuesta por 150 a 200 residuos de adenosina, al extremo 3' del sitio de corte. (f) Así se produce el mRNA primario completo. (De J. E. Darnell, Jr., «The Processing of RNA.» Copyright © 1983 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos).

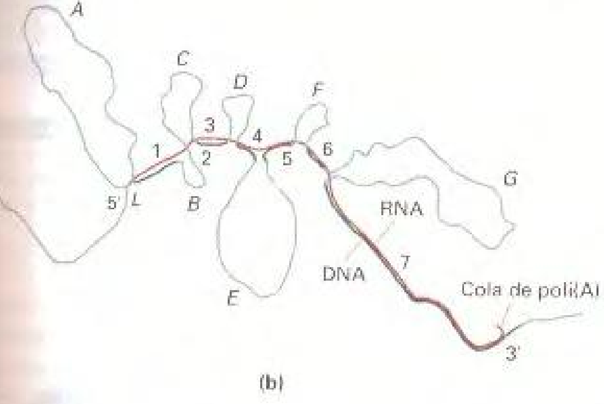
ción de segmentos internos antes de ser transportados al citoplasma. En la mayoría de los eucariotas superiores estudiados, esto se aplica no sólo al mRNA, sino también al rRNA, e incluso en algunos casos al tRNA.

La Figura 10-16 muestra la organización del gen de la ovoalbúmina de pollo, una proteína compuesta por 386 aminoácidos. Los segmentos de DNA que contienen la información para la síntesis de la proteína están interrumpidos por secuencias denominadas **intrones**. En la Figura 10-16 estos segmentos se designan con las letras *A* a *G*. El transcrito primario se procesa mediante una serie de reacciones de «corte y empalme», igual que un mensaje grabado en una cinta puede ser cortado y empalmado. El procesamiento conduce a la eliminación de intrones y al empalme de las regiones informativas, denominadas **exo**
produciendo un mRNA cuya secuencia es exactamente coli
con la secuencia de la ovoalbúmina. En la Figura 10-16, los
nes aparecen indicados por la letra *L* y los números 1 a 7
diferentes genes, se han detectado intrones con una longitud
hasta 2000 pares de bases. Algunos genes contienen hasta
intrones.

Es obvio que el procesamiento ocurre después de la trans
ción y en varios pasos, porque es posible aislar tanto transcr
de RNA (denominados anteriormente RNA nuclear heter
neo, o HnRNA) que corresponden a toda la región genética
trones + exones), como transcritos de tamaño intermedio,
estos transcritos de longitud intermedia ya se han eliminado



(a)



(b)



(c)

Figura 10-16. Organización en fragmentos separados del gen de la proteína ovoalbúmina. (a) La micrografía electrónica y (b) su representación esquemática muestran el resultado de un experimento en el que una cadena sencilla de una molécula de DNA que incluye el gen de la proteína de la clara de huevo (ovoalbúmina) se dejó hibridar con mRNA para la ovoalbúmina, la molécula a partir de la cual se traduce la proteína. Los segmentos de cadena sencilla que sobresalen a modo de bucles corresponden a los intrones. (c) La representación esquemática del gen muestra los siete intrones (en verde claro), los ocho exones (en verde oscuro) y el número de pares de bases de cada uno; el tamaño de los intrones varía desde los 251 pares de bases del intrón B hasta los cerca de 1600 de G. (Tomado de P. Chambon, «Split Genes». Copyright © 1981 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos).

intrones, pero otros se mantienen. En la Figura 10-17 se resume la secuencia de pasos en el procesamiento del RNA.

Procesamiento alternativo

Mediante la utilización de rutas alternativas de procesamiento se pueden producir diferentes mRNA y, por lo tanto, diferentes proteínas a partir de un único transcrito primario. Las distintas formas proteicas que se generan por procesamiento alternativo suelen aparecer en tipos celulares diferentes o en diferentes etapas del desarrollo. La Figura 10-18 muestra la amplia gama de combinaciones producidas por el procesamiento diferencial del transcrito primario del gen de la tropomiosina α. Así se genera un conjunto de proteínas relacionadas, cada una de ellas con un funcionamiento óptimo en un tipo celular concreto.

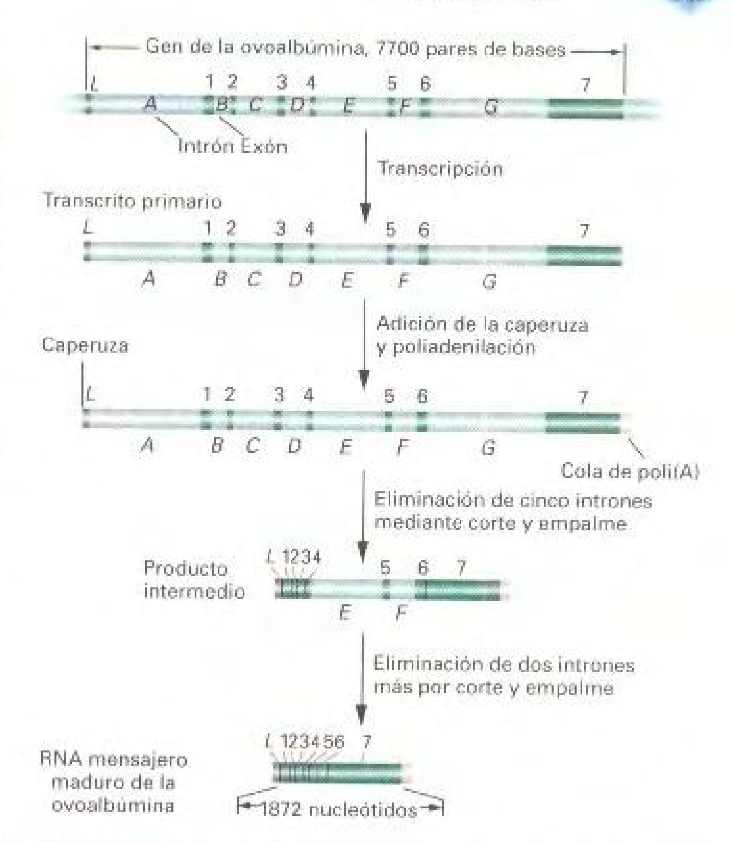


Figura 10-17. El mRNA maduro se produce en varios pasos. (Tomado de P. Chambon, «Split Genes». Copyright © 1981 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

Mecanismo de corte y empalme

La secuenciación de las uniones exón-intrón ha puesto de manifiesto que existen secuencias específicas muy conservadas en estas posiciones. Como se muestra en la Figura 10-19, en prácticamente todos los casos analizados se encuentra la secuencia GU en el punto de corte 5′ del intrón y AG en el 3′. Se ha demostrado que estas secuencias son reconocidas por moléculas de RNA nucleares pequeñas (snRNA) en una reacción en la que se coordina la complementariedad entre bases con la acción de las enzimas implicadas. La propia reacción de corte y empame se ilustra en la Figura 10-20, en la que se muestra la eliminación de un intrón en forma de «lazada», como resultado de dos reacciones de transesterificación. Las reacciones consisten en el intercambio de un enlace fosfoéster por otro, dando como resultado la fusión o ligación de dos exones.

Los snRNA se asocian con proteínas para formar partículas ribonucleoproteicas pequeñas (snRNP). En células superiores, las

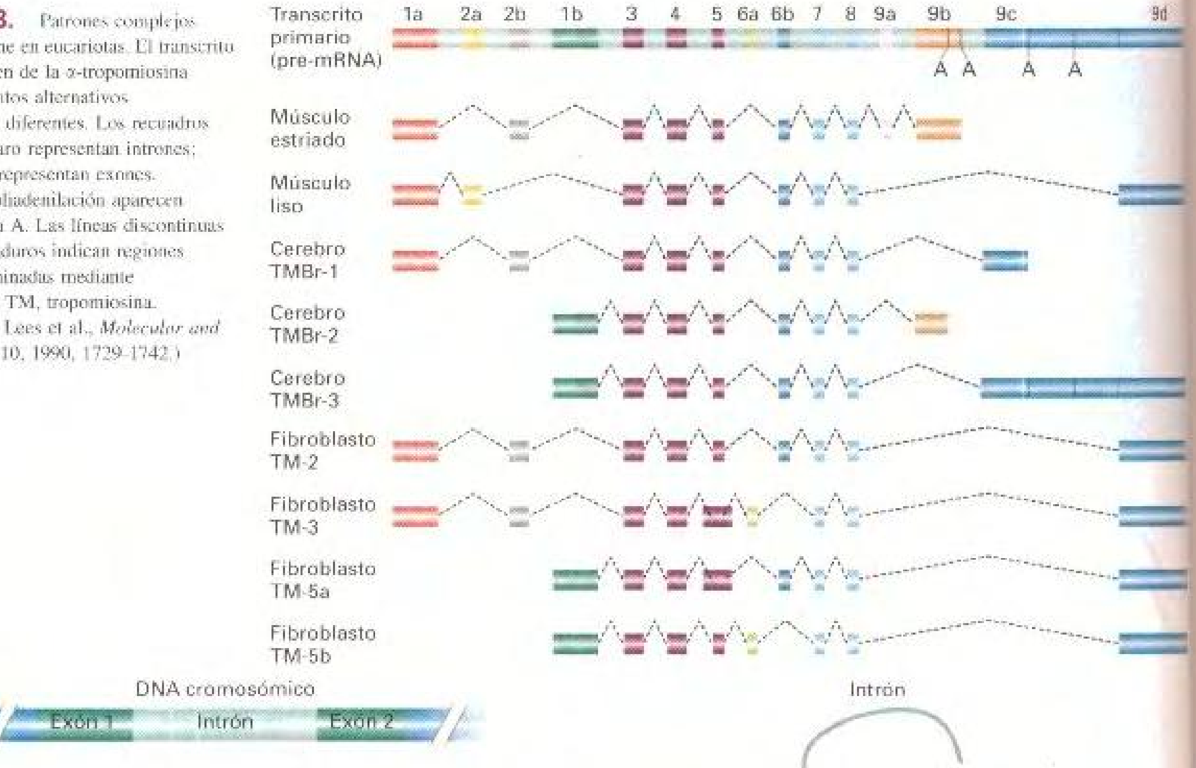


Figura 10-18. Patrones complejos de corte y empalme en eucariotas. El transcrito pre-mRNA del gen de la α-tropomiosina sufre procesamientos alternativos en tipos celulares diferentes. Los recuadros de color verde claro representan intrones; los otros colores representan exones. Las señales de poliadenilación aparecen indicadas con una A. Las líneas discontinuas en los mRNA maduros indican regiones que han sido eliminadas mediante corte y empalme. TM, tropomiosina. (Tomado de J. P. Lees et al., *Molecular and Cellular Biology* 10, 1990, 1729-1742.)

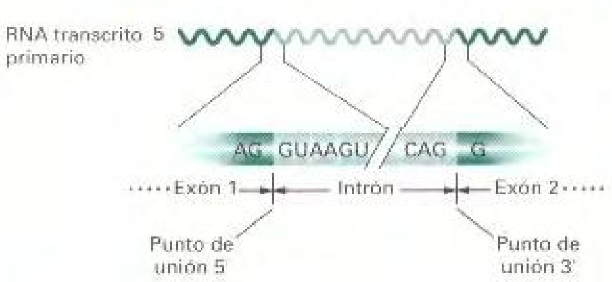


Figura 10-19. Secuencias consenso en los sitios 3' y 5' donde se produce el corte y empalme de los mRNA eucarióticos. Casi todos los intrones comienzan con GU y terminan con AG. Del análisis de las regiones fronterizas entre muchos exones e intrones, se han podido establecer unas secuencias consenso de nucleótidos que aparecen preferentemente en los extremos 5' y 3'. Además de la secuencia AG, hay otros nucleótidos situados justo aguas arriba del sitio 3' que también son importantes para que el proceso de corte y empalme ocurra correctamente. (Tomado de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski, y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski, y Mark Zoller.)

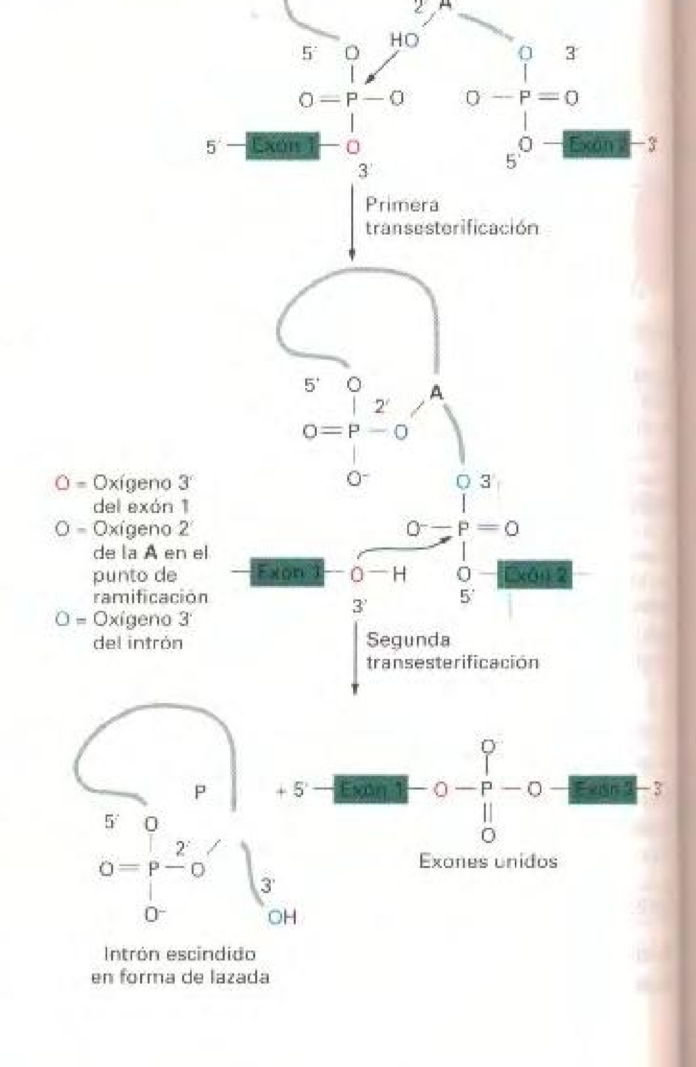


Figura 10-20. El empalme de los exones del transcrito primario ocurre mediante dos reacciones de transesterificación. En la primera reacción, el enlace éster entre el fósforo 5' del intrón y el oxígeno 3' (en rojo) del exón 1 se intercambia por un enlace éster con el oxígeno 2' (en azul oscuro) del residuo A del punto de ramificación. En la segunda reacción, el enlace éster entre el fósforo 5' del exón 2 y el oxígeno 3' (en azul claro) del intrón se intercambia por enlace éster con el oxígeno 3' del exón 1, provocando la liberación del intrón en forma de lazada y la unión de los dos exones. Las flechas señalan las posiciones donde los oxígenos activados reaccionan con los átomos de fósforo. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, y J. Darnell, *Molecular Biology of the Cell*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)



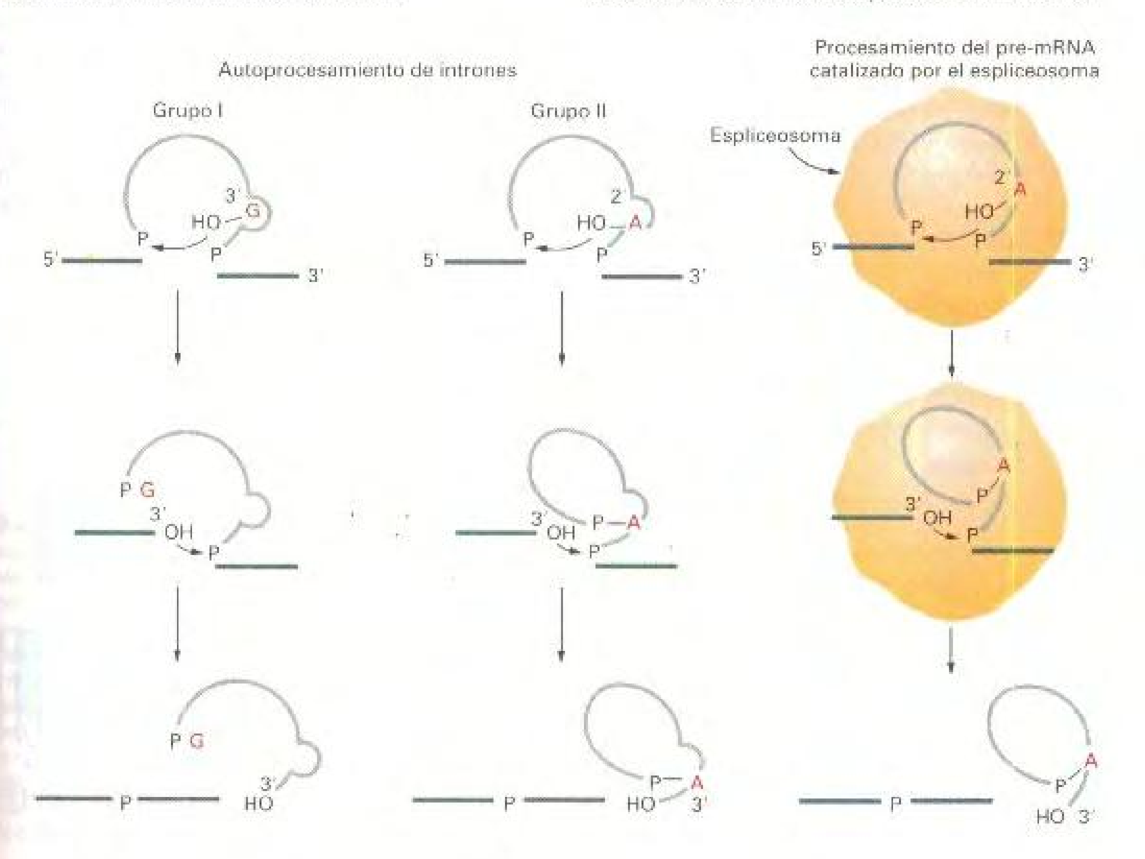
Figura 10-21. Fotografía con el microscopio electrónico del espliceosoma. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.).

snRNP, el transcrito primario, y factores asociados se unen constituyendo un complejo ribonucleoproteico de peso molecular elevado (60S) denominado **espliceosoma** (Fig. 10-21), que catalizan las reacciones de transesterificación descritas.

Autoprocesamiento

Actualmente, se conocen numerosos ejemplos de moléculas de RNA que pueden catalizar el procesamiento de sus intrones sin la ayuda de proteínas. Esta capacidad de autoprocesamiento fue descubierta por Thomas Cech y colaboradores en *Tetrahymena*, y constituyó la primera demostración de que una molécula de RNA puede actuar como una enzima y catalizar una reacción biológica específica. Estos RNA con actividad catalítica se denominan *ribozimas*. Según el mecanismo específico de procesamiento, los intrones que se autoprocesan se clasifican en grupo I o grupo II. Los intrones del grupo I se encuentran en transcritos primarios de algunos virus de *E. coli*, de *Tetrahymena* y de algunos otros organismos unicelulares, en mitocondrias y cloroplastos, y en algunos tRNA primarios de bacterias. Los intrones del grupo II se encuentran en algunos tRNA primarios y en algunos transcritos primarios de mitocondrias y cloroplastos. En la Figura 10-22 se muestra un esquema de las diferencias en el mecanismo de procesamiento de los intrones del grupo I, del grupo II y

Figura 10-22. Mecanismo de autoprocesamiento de los intrones de los grupos I y II, y procesamiento del mRNA por el espliceosoma. El intrón se indica en color azul; los exones que han de unirse se indican en rojo. En los intrones del grupo I (*a la izquierda*), el cofactor guanosina (**G**) se asocia con el centro activo. El grupo hidroxilo 3' de esta guanosina participa en una reacción de transesterificación con el fosfato del extremo 5' del intrón; esta reacción es análoga a la que se produce con el grupo hidroxilo 2' de la **A** del sitio de ramificación en el procesamiento de los intrones del grupo II y del pre-mRNA. La siguiente transesterificación, que conduce a la unión de los exones 5' y 3', es similar en los tres mecanismos de corte y empalme. Observe que los intrones del grupo I se liberan como moléculas lineales y no como las estructuras ramificadas que se producen en los otros dos casos. (Tomado de P. A. Sharp, *Science* 235, 1987, 769.)



de los dependientes del aparato procesador. El producto resultante de la eliminación de un intrón del grupo I no tiene forma de lazada, sino que es una molécula lineal.

Traducción

Aunque el mRNA dirige la síntesis proteica, si mezclamos mRNA y los 20 aminoácidos en un tubo de ensayo con la esperanza de producir proteína, quedaremos defraudados. Es necesaria la presencia de otros componentes; el descubrimiento de la naturaleza de estos componentes fue clave para descifrar el mecanismo de la traducción. Una técnica de centrifugación sencilla pero elegante contribuyó al descubrimiento de estos componentes adicionales.

Aplicaciones de los gradientes de sacarosa

Para crear un **gradiente de densidad de sacarosa**, se depositan en un tubo de ensayo, una sobre otra, capas sucesivas de soluciones de sacarosa cada vez menos concentradas. Luego, se coloca cuidadosamente el material a estudiar sobre la superficie. Cuando la solución se centrifuga en un aparato que permite que el tubo bascule libremente, el material que está sedimentando progresa a través del gradiente a diferentes velocidades dependiendo de los tamaños y formas de las moléculas. En un período fijo de tiempo, las moléculas de mayor tamaño avanzan más que las moléculas pequeñas. Las moléculas separadas pueden recuperarse en distintas fracciones mediante la recolección continua de gotas a partir de un pequeño orificio practicado en la parte inferior del tubo (Fig. 10-23). El tiempo que una determinada fracción tarda en recorrer la distancia fija hasta el fondo del tubo refleja su valor de sedimentación (S), que es una medida del tamaño de las moléculas presentes en dicha fracción.

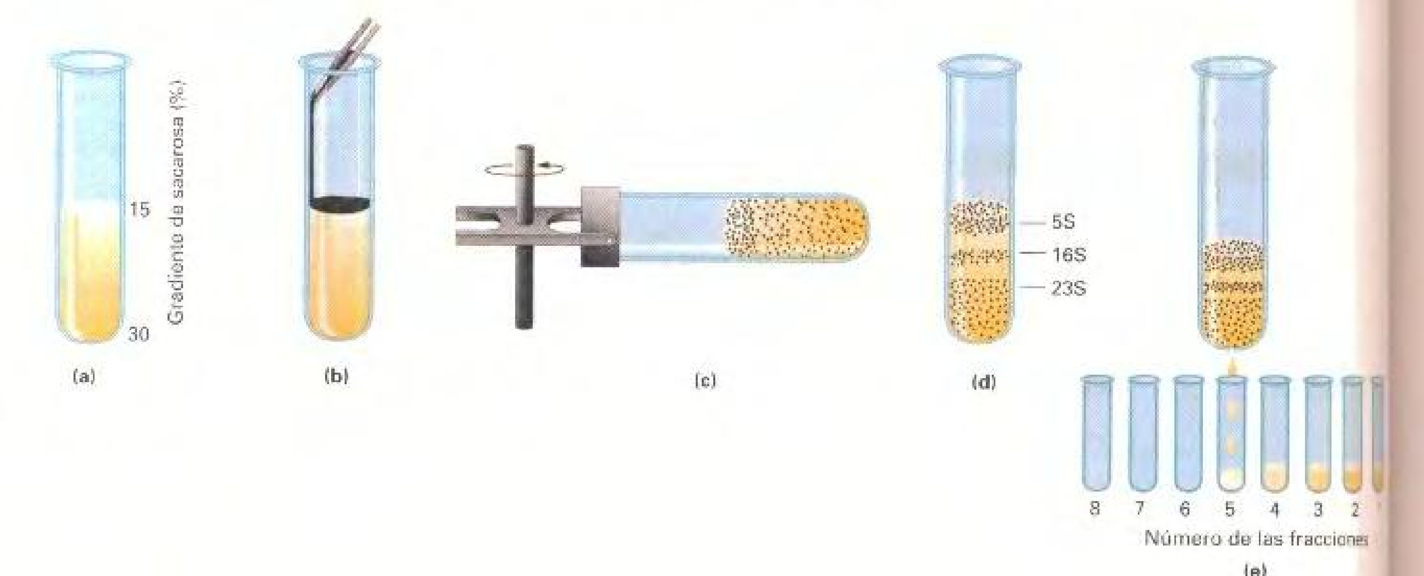
Es importante destacar las diferencias entre un gradiente de sacarosa y el gradiente de CsCl que describimos en el Capítulo 8. En un gradiente de CsCl, las moléculas en estudio tienen una densidad intermedia entre la de la solución menos concentrada y la de la solución más concentrada de CsCl. Por tanto, en el equilibrio, las moléculas formarán una banda en una posición concreta del gradiente. En un gradiente de sacarosa, las moléculas en estudio son más densas que cualquiera de las soluciones de sacarosa utilizadas y, en el equilibrio, se encontrarían todas ellas en el fondo del tubo formando un precipitado. No obstante, migran hacia el fondo del tubo a velocidades diferentes, dependiendo de su forma y tamaño. Comparando las posiciones de las distintas moléculas en el gradiente en un momento determinado podemos determinar sus tamaños relativos.

Los principales componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas pudieron separarse según su tamaño haciendo uso del poder de fraccionamiento de la técnica del gradiente de sacarosa (Fig. 10-23). Las moléculas de RNA transferente (4S) pudieron distinguirse fácilmente de los RNA ribosómicos, que están constituidos por tres clases: 23S, 16S y 5S. Estos tamaños aparecen resumidos en el Cuadro 10-2.

Variación genética

Si los genes son segmentos de DNA y el DNA es una simple sucesión de pares de nucleótidos, ¿cómo dictan las secuencias de pares de nucleótidos las secuencias de aminoácidos de las proteínas? De inmediato, se nos ocurre la analogía con un código. Cómo llegó a descifrarse el código genético es la historia que

Figura 10-23. Técnica del gradiente de sacarosa. (a) El gradiente se genera por centrifugación de un tubo en el que se han depositado capas sucesivas de soluciones de sacarosa de distinta densidad. (b) La muestra que se desea analizar se deposita sobre la superficie del gradiente. (c) Durante la centrifugación, los diferentes componentes (fracciones) de la muestra sedimentan diferencialmente. (d) Las diferentes fracciones forman bandas en el gradiente centrifugado. (e) Las diferentes bandas se recogen por separado tomando muestras desde el fondo del tubo a intervalos fijos de tiempo. El valor S de cada fracción depende de su posición en el gradiente, que está relacionado con el tiempo que tarda en salir por el fondo del tubo. (Tomado de A. Rich, «Polyribosomes». Copyright © 1963 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)



CUADRO 10-2. Moléculas de RNA de *E. coli*

Tipo	Porcentaje del RNA celular	Coeficiente de sedimentación (S)	Peso molecular	Número de nucleótidos
RNA ribosómico (rRNA)	80	23	1.2×10^6	3700
		16	0.55×10^6	1700
		5	3.6×10^4	1700
RNA transferente (tRNA)	15	4	2.5×10^4	75
RNA mensajero (mRNA)	5		Heterogéneo	Variable

Fuente: L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.

...claremos en esta sección. La experimentación fue sofisticada y rápida, y no tardó mucho en descifrarse el código, una vez que su existencia parecía segura.

Por pura lógica, si los nucleótidos constituyen las «letras» del código, la combinación de estas letras puede originar «palabras» que representen diferentes aminoácidos. Una pregunta obligada atañe a la lectura de este código. ¿Es o no solapada? Luego podemos preguntarnos cuántas letras del mRNA son necesarias para constituir una palabra, o **codón**, y qué codón o codones representan cada aminoácido específico.

Código solapado *versus* no solapado

La Figura 10-24 muestra la diferencia entre un código solapado y uno no solapado. En el ejemplo, se muestra un código de tres letras o **tripletes**. En un código no solapado, los sucesivos aminoácidos están determinados por palabras sucesivas del mensaje (codones), como se muestra en la parte inferior de la Figura 10-24. En un código solapado, los sucesivos aminoácidos están determinados en el mRNA por codones que comparten algunas

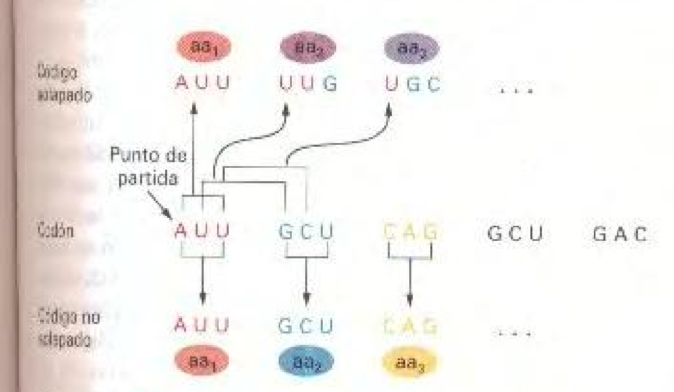


Figura 10-24. Diferencia entre un código solapado y uno no solapado. El ejemplo corresponde a un código de tres letras (un código de tripletes). Un código solapado utilizaría codones con algún nucleótido en común en la traducción de una misma proteína, tal como se ilustra en la parte superior del esquema (referente a la secuencia de mRNA que aparece en la parte central del esquema). En un código no solapado, los codones que se leen en la traducción de una proteína no comparten ningún nucleótido. Observe que la designación de los aminoácidos como aa_1, aa_2, etc. en ambos modelos no implica que los aminoácidos sean idénticos. Dado que los tripletes que componen los codones respectivos para el aa_3, por ejemplo, son diferentes según el modelo, es muy probable que los aminoácidos también lo sean. La coincidencia numérica entre aminoácidos sólo implica una coincidencia en la posición que ocupan en la cadena proteica.

bases consecutivas; por ejemplo, las dos últimas bases de un codón serían también las dos primeras del siguiente. Los codones solapados se muestran en la parte superior de la Figura 10-24. Así pues, para la secuencia AUUGCUCAG, en un código no solapado, los tres primeros aminoácidos estarían cifrados por los tripletes AUU, GCU y CAG, respectivamente. Sin embargo, en un código solapado y con un solapamiento de dos bases, los tres primeros aminoácidos estarían cifrados por los tripletes AUU, UUG y UGC, como se indica en la Figura 10-24.

Ya en 1961 parecía claro que el código genético no era solapado. El análisis de proteínas alteradas por mutación, en particular, los mutantes del virus del mosaico del tabaco obtenidos con ácido nitroso, puso de manifiesto que sólo cambiaba un aminoácido a la vez en una región determinada de la proteína. Esto es precisamente lo que produce un código no solapado. Como se indica en la Figura 10-24, un código solapado implicaría que el cambio de una sola base alteraría a la vez tres aminoácidos adyacentes de la proteína.

Cabe destacar que, aunque la existencia de un *código* solapado fue descartada del análisis de proteínas individuales, nada excluía el uso de fases de lectura alternativas para determinar los aminoácidos de dos proteínas distintas. En nuestro ejemplo, una proteína estaría cifrada por la serie de codones que se lee como AUU, GCU, CAG, CUU, etc. Una segunda proteína podría estar cifrada por codones desplazados una base y que serían, por tanto, UUG, CUC, AGC, UUG, etc. Esto constituye un ejemplo de almacenamiento de la información que cifra dos proteínas distintas en dos fases de lectura diferentes, manteniéndose el uso de un código de lectura no solapada durante la traducción de una proteína *concreta*. Se conocen algunos ejemplos de este tipo de cambios en la fase de lectura.

El número de letras de cada codón

Al leer una molécula de mRNA a partir de uno de sus extremos, sólo podemos encontrar una de las cuatro bases posibles, A, U, G o C. Por lo tanto, si las palabras estuvieran constituidas por una sola letra, sólo serían posibles cuatro palabras. El código genético no puede estar basado en un vocabulario tan limitado, ya que debemos contar con una palabra para cada uno de los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas celulares. Si las palabras estuvieran formadas por dos letras, entonces dispondríamos de $4^2 = 16$ palabras posibles; por ejemplo, AU, CU o CC. Este vocabulario sigue siendo limitado.

Si las palabras fuesen de tres letras, serían posibles $4^3 = 64$ palabras; por ejemplo, AUU, GCG o UGC. Este vocabulario sería ya más que suficiente para constituir el código. Podemos concluir, por tanto, que las palabras del código deben estar formadas por al menos tres pares de nucleótidos. Sin embargo, si todas las palabras fueran «tripletes», dispondríamos de muchas más palabras que las 20 necesarias para especificar los aminoácidos comunes.

Uso de supresores para demostrar la clave de tripletes

Pruebas convincentes de que un codón está realmente constituido por tres letras (y no más de tres) se obtuvieron en experimentos genéticos de gran belleza, dados a conocer en 1961 por Francis Crick, Sidney Brenner y colaboradores, y realizados con mutantes del locus *rII* del fago T4. Indujeron mutaciones que producen el fenotipo rII (véase el Cap. 9) empleando un compuesto denominado *proflavina*, del que se suponía que actuaba por adición o deleción de un solo par de nucleótidos en el DNA. (Esta suposición se basaba en pruebas experimentales que aquí no se incluyen). Los siguientes ejemplos ilustran la acción de la proflavina sobre el DNA de cadena doble.

—ATCTGTCT— —TAGACAGA— → (inserción) —ATCTAGTCT— —TAGATCAGA—

—ATCTGTCT— —TAGACAGA— → (deleción) —ATCTGTT— —TAGACAA—

Partiendo de una mutación particular inducida con proflavina, a la que llamaron FCO, Crick y sus colaboradores encontraron «reversiones» (recuperaciones del fenotipo normal) que detectaron por la formación de halos de lisis silvestres sobre la estirpe K(λ) de *E. coli*. El análisis genético de estos halos puso de manifiesto que los «revertientes» no eran exactamente iguales que el silvestre, sugiriendo así que la segunda mutación no era una reversión precisa de la mutación original. De hecho, la reversión se debía a la presencia de una *segunda mutación* en un sitio diferente del de la mutación FCO, aunque en el mismo gen; esta segunda mutación «suprimía» el fenotipo mutante causado por la mutación FCO. Recuerde del Capítulo 4 que una **mutación supresora** es la que contrarresta o suprime los efectos de otra mutación.

Cuando la mutación supresora se separó por recombinación de la primera mutación se observó que la propia mutación supresora era también una mutación *rII* (Fig. 10-25).

¿Cómo explicaríamos estos resultados? Si suponemos que la lectura es polarizada, es decir, si el gen se lee desde un único extremo, entonces, la adición o deleción provocada originalmente por la proflavina podría provocar el fenotipo mutante, al interrumpir el mecanismo normal de lectura responsable de establecer los grupos de bases que han de interpretarse como palabras. Por ejemplo, si cada tres bases en el mRNA constituyen una palabra, entonces la «fase de lectura» se establecería tomando las tres primeras bases del extremo como la primera palabra, las tres siguientes como la segunda palabra y así sucesivamente. En tal caso, la adición o deleción de un solo par de bases induci-



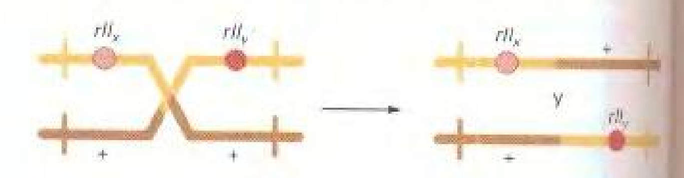


Figura 10-25. El supresor de una mutación *rII*, cuando se separa por recombinación de la mutación *rII*, resulta ser él mismo una mutación *rII*. El mutante original, FCO, se obtuvo mediante tratamiento con proflavina. Luego, cuando la estirpe FCO se trató de nuevo con proflavina, se encontró un revertiente que, a primera vista, parecía silvestre. Sin embargo, se observó que se había inducido una segunda mutación en la región *rII*, y que el doble mutante $rII_x rII_y$ se comportaba como la estirpe silvestre.

da con proflavina cambiaría la fase de lectura del mRNA desde ese punto en adelante, provocando la lectura errónea de todas las palabras siguientes. Esta **mutación de cambio de fase** podría convertir gran parte del mensaje genético en un auténtico galimatías. No obstante, una deleción o adición de un par de bases en otro sitio cercano restablecería la fase de lectura, limitando el galimatías al corto trecho entre los dos sitios mutados. Considere el siguiente ejemplo, en el que se usan palabras de tres letras para representar codones:

	CON	TEO	HAN	IDO	DOS	MAS
Si quitamos la H:	CON	TEO	ANI	DOD	OSM	AS
Si insertamos la E:	CON	TEO	ANE	IDO	DOS	MAS

La inserción suprime el efecto de la deleción porque restablece el sentido de casi toda la frase. Por sí sola, sin embargo, la inserción también cambiaría el sentido de la frase:

CON TEO HAN EID ODO SMA S

Si suponemos que el mutante FCO se debe a una adición, entonces la segunda mutación (supresora) tuvo que ser una deleción porque, como hemos visto, así se restablecería la fase de lectura del mensaje resultante (una segunda inserción no la corregiría). En los siguientes diagramas, por simplicidad, utilizamos una cadena hipotética de nucleótidos para representar el RNA. También suponemos que las palabras del código están formadas por tres letras y se leen en una dirección concreta (de izquierda a derecha en nuestros diagramas).

1. Mensaje silvestre

CAU CAU CAU CAU CAU

2. Mensaje rII_a: las palabras distales cambian (x) debido a una mutación de cambio de fase (las palabras marcadas con ✓ permanecen igual)

Adición

CAU	ACA	UCA	UCA	UCA	U
✓	×	×	×	×	

3. Mensaje $rII_a rII_b$: algunas palabras erróneas, pero la fase de lectura se recupera en palabras sucesivas

Deleción ↓

CAU	ACA	UCU	CAU	CAU
✓	×	×	✓	✓

Las pocas palabras incorrectas en el genotipo suprimido explicarían que los «revertientes» (fenotipos suprimidos) que Crick y sus colaboradores encontraron no fueran fenotípicamente iguales que el verdadero silvestre.

Hemos dado por supuesto que la mutación original era una adición, pero la explicación sería la misma si la mutación original FCO fuera una deleción y la mutación supresora fuera una adición. Si asignamos el signo (+) a la mutación FCO, entonces la mutación supresora sería automáticamente de signo contrario (−). Se ha demostrado experimentalmente que una mutación (+) no puede suprimir a otra mutación (+), y una (−) tampoco puede suprimir a otra (−). En otras palabras, dos mutaciones del mismo signo nunca actúan como supresora una de la otra. Sin embargo, se ha demostrado que las combinaciones de *tres* mutaciones (+) o de *tres* mutaciones (−) pueden actuar conjuntamente restaurando el fenotipo silvestre.

Esta observación supuso la primera prueba experimental de que las palabras del código genético estaban compuestas por tres pares de nucleótidos consecutivos o tripletes. Sólo si las palabras son tripletes, se explica que tres adiciones o tres deleciones de un par de nucleótidos restauren automáticamente la fase de lectura del mRNA. Por ejemplo,

Deleciones

CAU	CAU	CAU	CAU	CAU	CAU	CAU
CAU	ACA	UAU	CAU	CAU	CAU	
✓	×	×	✓	✓	✓	

Las pruebas de que las deducciones genéticas sobre la proflavina eran correctas proceden del análisis de mutaciones inducidas con proflavina en un gen cuyo producto proteico podía ser analizado. George Streisinger trabajó con el gen de la enzima lisozima, cuya secuencia de aminoácidos conocía. Utilizando proflavina, indujo una mutación en el gen y luego seleccionó revertientes inducidos también con proflavina, que genéticamente resultaron ser mutantes dobles (con mutaciones de signo opuesto). Como había predicho, al analizar la proteína de uno de los mutantes dobles, encontró un trecho de aminoácidos distintos entre dos extremos silvestres:

Silvestre:

—Thr—Lys—Ser—Pro—Ser—Leu—Asn—Ala

Revertiente:

—Thr—Lys—Val—His—His—Leu—Met—Ala

Degeneración del código genético

El trabajo de Crick sugería también que el código genético era **degenerado**. Esta expresión no pretende ser una descalificación moral. Alude simplemente a que cada uno de los 64 tripletes debe tener algún significado en el código y, por tanto, al menos algunos de los aminoácidos deben de estar representados por dos o más tripletes distintos. Si sólo se usaran 20 tripletes (careciendo de sentido los 44 tripletes restantes, que no cifrarían ningún aminoácido), entonces se esperaría que la mayoría de las mutaciones de cambio de fase dieran lugar a palabras sin sentido, conduciendo presumiblemente a una paralización del proceso de fabricación de la proteína. Si así fuera, la supresión de los cambios de fase no ocurriría nunca o casi nunca. Si, por el contrario, todos los tripletes cifraran un aminoácido, entonces los cambios en las palabras simplemente provocarían la incorporación de aminoácidos erróneos en la proteína. Estas consideraciones llevaron a Crick a razonar que muchos de los aminoácidos, si no todos, tendrían varios nombres distintos en el código de pares de bases, hipótesis que posteriormente fue confirmada bioquímicamente.

COROLARIO

Los trabajos presentados hasta aquí demuestran que

1. **El código genético no es solapado.**
2. **Tres bases cifran un aminoácido. Estos tripletes se denominan codones.**
3. **El mensaje empieza a leerse a partir de un punto fijo y el proceso de lectura continúa hasta el final de la secuencia informativa. Sabemos que es así porque una sola mutación de cambio de fase en cualquier parte de la secuencia informativa altera el alineamiento de los codones del resto de la proteína.**
4. **El código es degenerado, en el sentido de que algunos aminoácidos están representados por más de un codón.**

El desciframiento del código

El desciframiento del código genético (la determinación del aminoácido cifrado por cada triplete) ha sido uno de los logros genéticos más excitantes de los últimos 50 años. Una vez que se dispuso de las técnicas experimentales necesarias, el código genético no tardó en descifrarse.

El primer logro fue descubrir la manera de producir mRNA sintético. Si se mezclan los nucleótidos del RNA con una enzima especial, la fosforilasa de polinucleótidos, se produce una reacción de síntesis de RNA de cadena sencilla. Esta síntesis ocurre en ausencia de DNA, por lo que los nucleótidos se incorporan al azar. Esta capacidad de sintetizar mRNA ofrecía la excitante posibilidad de crear moléculas de mRNA con secuencias particulares y analizar los aminoácidos determinados en ellas. El primer mensajero sintético obtenido, poli(U), se generó mezclando sólo nucleótidos de uracilo con la enzima sintetizadora de RNA, lo que produce —UUUU—. En 1961, Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei mezclaron poli(U) con la maquinaria de síntesis de proteínas de *E. coli in vitro* y ¡*observaron la formación de proteína*! La excitación giraba principalmente en torno a cuál sería la secuencia de la proteína. Resultó ser polifenilalanina —una cadena de moléculas de fenilalanina unidas entre sí constituyen-

do un polipéptido—. Así se concluyó que el triplete UUU debía cifrar fenilalanina:

-UUU UUU UUU UUU UUU UUU-

-Phe-Phe-Phe-Phe-Phe-Phe-

Este tipo de análisis se repitió, pero ahora realizando la síntesis de mRNA sintético a partir de mezclas con proporciones establecidas de más de un nucleótido. En uno de tales experimentos, se mezclaron los nucleótidos uracilo y guanina en la proporción 3:1. La frecuencia relativa de aparición de cada triplete en la secuencia, cuando los nucleótidos se incorporan aleatoriamente en el mRNA sintético, puede calcularse a partir de la proporción relativa de los diferentes nucleótidos presentes en la mezcla (Cuadro 10-3). Observe que, en el Cuadro 10-3, la frecuencias de los posibles tripletes aparecen normalizadas respecto a la frecuencia del triplete UUU. Por ejemplo, UUG, se espera que aparezca con una frecuencia $p(\text{UUG}) = 9/64$, que es tres veces inferior a la de UUU, cuya frecuencia esperada es $p(\text{UUU}) = 27/64$. En otras palabras, $p(\text{UUG})/p(\text{UUU}) = 1/3 = 0.33$, que coincide con el valor mostrado para UUG en el Cuadro 10-3.

Si cada uno de estos codones cifrara un aminoácido diferente (es decir, si no fueran redundantes), los aminoácidos generados por esta mezcla particular de guanina y uracilo deberían aparecer en las mismas proporciones que los diferentes codones. Ciertamente, aunque algunos de estos codones son redundantes, las proporciones de aminoácidos obtenidas a partir de esta mezcla de bases (Cuadro 10-4) se ajustan bastante bien a las proporciones de los distintos codones del Cuadro 10-3. (En el Cuadro 10-4, los valores están referidos a la frecuencia obtenida para fenilalanina).

A partir de estos datos, podemos deducir que los codones formados por una guanina y dos uracilos (G + 2U) determinan valina, leucina y cisteína, aunque no podamos asignar la secuencia específica de los tripletes que cifran cada uno de estos aminoácidos. De igual modo, un uracilo y dos guaninas (U + 2G) deben determinar triptófano, glicina y quizás algún otro. Parece que el modelo de Watson y Crick es correcto en su predicción de la

CUADRO 10-3. Frecuencia esperada de varios codones en un mRNA sintético compuesto por $\frac{3}{4}$ de uracilo y $\frac{1}{4}$ de guanina

Codón	Probabilidad	Razón*
UUU	$p(\text{UUU}) = \frac{3}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{3}{4} = \frac{27}{64}$	1.00
UUG	$p(\text{UUG}) = \frac{3}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{9}{64}$	0.33
UGU	$p(\text{UGU}) = \frac{3}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{3}{4} = \frac{9}{64}$	0.33
GUU	$p(\text{GUU}) = \frac{1}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{3}{4} = \frac{9}{64}$	0.33
UGG	$p(\text{UGG}) = \frac{3}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{3}{64}$	0.11
GGU	$p(\text{GGU}) = \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{3}{4} = \frac{3}{64}$	0.11
GUG	$p(\text{GUG}) = \frac{1}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{3}{64}$	0.11
GGG	$p(\text{GGG}) = \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{64}$	0.03

* La frecuencia de UUU se ha utilizado como referencia en el cálculo de las frecuencias relativas de los otros codones. Por ejemplo, la frecuencia de UUG deriva del cociente $p(\text{UUG})/p(\text{UUU}) = 0.33$.

CUADRO 10-4. Frecuencias observadas de varios aminoácidos en las proteínas traducidas a partir de un mRNA sintético compuesto de $\frac{3}{4}$ de uracilo y $\frac{1}{4}$ de guanina

Aminoácido	Razón*
Fenilalanina	1.00
Leucina	0.37
Valina	0.36
Cisteína	0.35
Triptófano	0.14
Glicina	0.12

* La concentración de fenilalanina se ha utilizado como referencia para el cálculo de la concentración relativa de los otros aminoácidos. Observe la correlación entre estos valores (razón) y los correspondientes del Cuadro 10-3.

importancia de la secuencia precisa de bases, además de la proporción en que aparecen. Siguiendo el procedimiento descrito para G y U, pronto se realizaron muchas asignaciones provisionales, principalmente por los grupos de trabajo de Nirenberg y de Severo Ochoa.

Antes de considerar otras palabras del código, analizaremos las moléculas de tRNA, que contribuyen a explicar el vínculo entre los codones del mRNA y el reconocimiento de aminoácidos concretos.

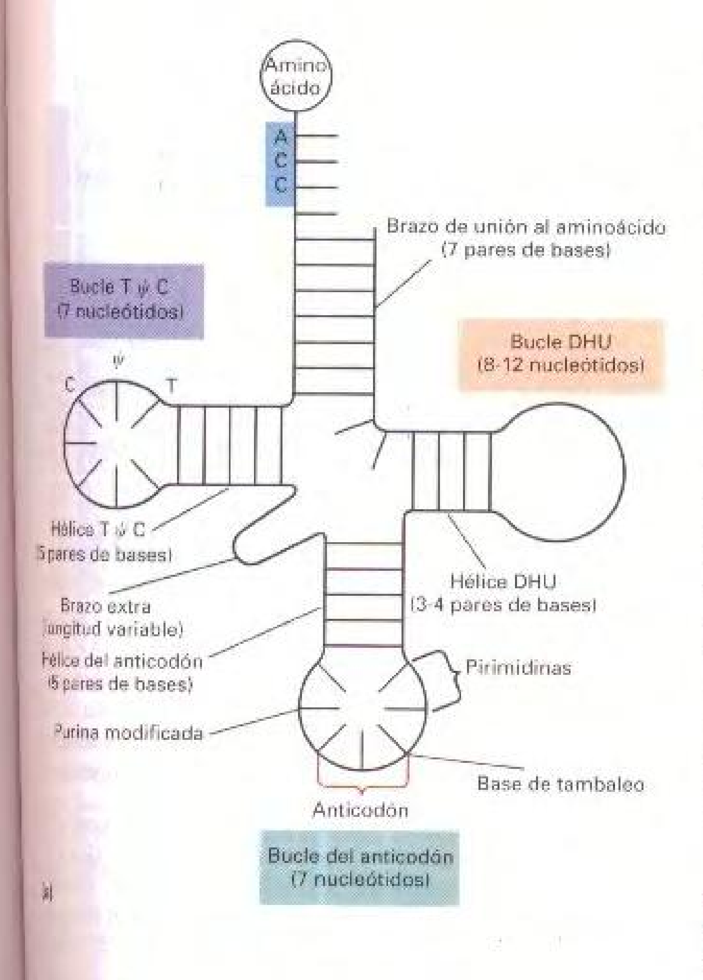
Reconocimiento de los codones por las moléculas de tRNA

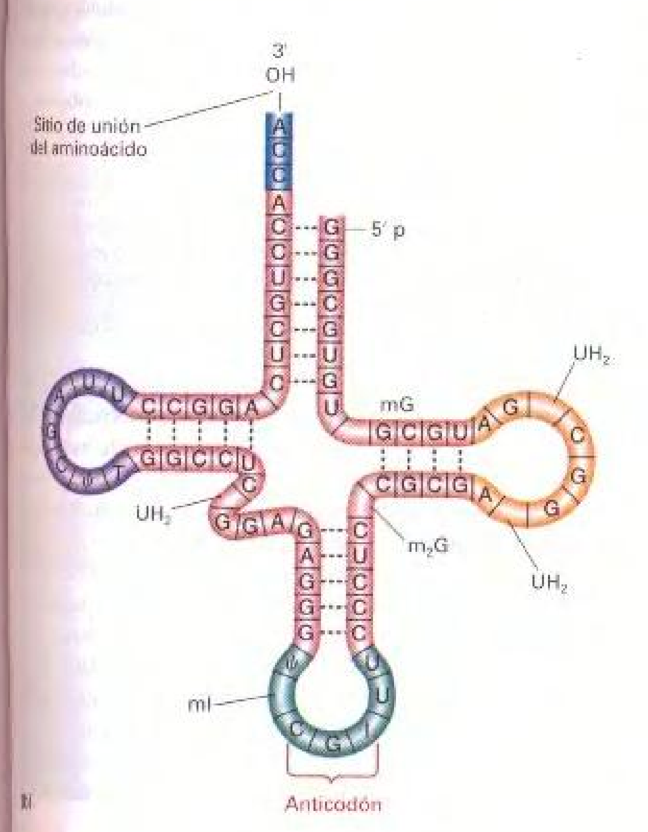
¿Es el tRNA o el propio aminoácido el que reconoce la porción del mRNA que cifra un aminoácido concreto? Un experimento muy convincente proporcionó la respuesta a esta pregunta. En dicho experimento, se trató el cisteinil-tRNA «cargado» con cisteína (tRNA^{Cys}) con hidruro de níquel, que convierte la cisteína unida al tRNA en el aminoácido alanina, sin afectar al tRNA.

$$\text{cisteína-tRNA}^{\text{Cys}} \xrightarrow{\text{hidruro de níquel}} \text{alanina-tRNA}^{\text{Cys}}$$

Las proteínas sintetizadas en presencia de esta especie híbrida presentaban alanina donde se esperaría cisteína. Así se demostró que los aminoácidos son «analfabetos» y que su inserción en el sitio correcto depende de los «adaptadores» de tRNA, que reconocen los codones del mRNA e insertan en la posición correcta el aminoácido al que están unidos. Cabría esperar, por tanto, que en cada molécula de tRNA haya un sitio capaz de reconocer el codón correspondiente en el mRNA por complementariedad entre bases.

La Figura 10-26*a* muestra varios sitios funcionales de la molécula de tRNA. El sitio que reconoce un codón en el mRNA se denomina **anticodón**; sus bases son complementarias y antiparalelas a las bases del codón. Otro sitio operativo identificable es el sitio de unión al aminoácido. Es probable que los otros brazos cooperen en la unión del tRNA al ribosoma. La Figura 10-26*b* muestra un tRNA concreto (el tRNA de levadura para alanina). Las estructuras en forma de hoja de trébol «plana» que aparecen en estos diagramas no corresponden a la conformación real adoptada por las moléculas de tRNA; normalmente, el tRNA adopta una estructura de hoja de trébol plegada en forma de

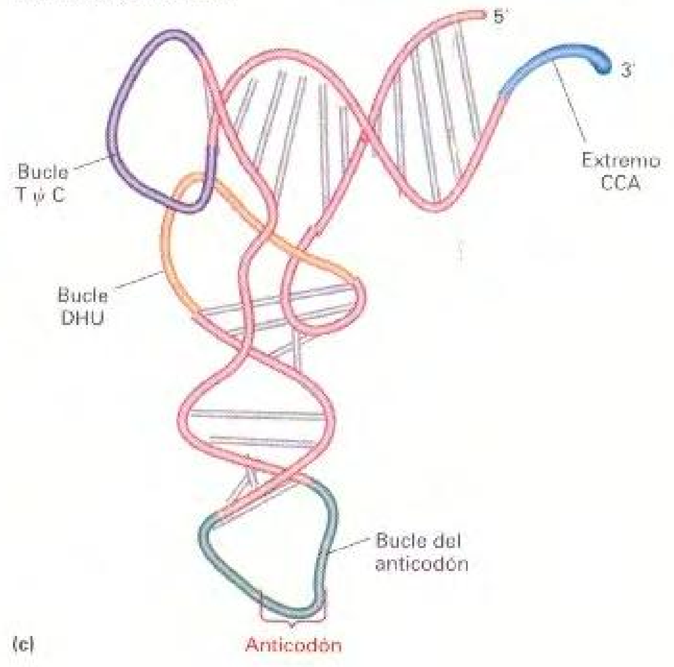




como se muestra en la Figura 10-26c. Estos diagramas se basan en análisis químicos muy sofisticados de las secuencias de nucleótidos de los tRNA y en datos cristalográficos sobre la estructura global de la molécula. Aunque el parecido estructural entre las distintas moléculas de tRNA es grande, cada una de ellas adopta una estructura tridimensional única que permite su reconocimiento por la sintetasa correcta, encargada de catalizar la unión de un tRNA con su aminoácido específico para formar el aminoacil-tRNA. (Las sintetasas se tratarán en el apartado sobre «La síntesis de proteínas»). La especificidad del sistema de carga de los tRNA es fundamental para mantener la integridad del proceso de síntesis proteica.

¿De dónde proceden los tRNA? Si se introduce tRNA radiactivo en un núcleo celular cuyo DNA ha sido desnaturalizado parcialmente mediante calor, la radiactividad aparece localizada (por autorradiografía) en regiones concretas de los cromosomas. Probablemente, estas regiones reflejan la localización de los genes de los tRNA; se trata de regiones del DNA que no producen mRNA, sino tRNA. El tRNA marcado hibrida en esas posiciones por la complementariedad entre su secuencia de bases y la del gen parental. Una situación similar ocurre con el rRNA. Vemos, pues, que ni siquiera la idea «un gen-un polipéptido» es absolutamente válida. Algunos genes no cifran proteínas: en su lugar, determinan moléculas de RNA que forman parte de la maquinaria de traducción.

Figura 10-26. Estructura del RNA transferente. (a) Regiones funcionales de cualquier molécula de tRNA. (b) Secuencia específica del tRNA de la alanina de levadura. Las flechas señalan distintos tipos de bases modificadas raras. (c) Esquema de la estructura tridimensional real del tRNA de la fenilalanina de levadura. Los símbolos ψ, mG, m_2G, mI, y DHU (UH_2) son abreviaturas de las bases modificadas pseudouridina, metilguanosina, dimetilguanosina, metilinosina y dihidrouridina, respectivamente. (Parte *a*, tomada de S. Arnott, «The Structure of Transfer RNA», *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 22, 1971, 186; partes *b* y *c*, tomadas de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer; parte *c*, basada en un dibujo de Sung-Hou Kim.)



COROLARIO

Algunos genes cifran proteínas; otros genes determinan RNA (tRNA o rRNA) como producto final.

¿Cómo adopta el tRNA su estructura tan curiosa? Probablemente, se pliega de forma espontánea en la conformación más estable. El RNA transferente contiene varias bases «raras» o modificadas (como el pseudouracilo, ψ) en sus nucleótidos; estas bases intervienen directamente en el plegamiento, además de cumplir otras funciones en el tRNA. Quizás haya advertido la existencia de algunos emparejamientos inusuales de bases en los lazos del tRNA en la Figura 10-26*b*, como una G emparejada por puentes de hidrógeno con una U (en vez de con una C). En el siguiente apartado se discute este emparejamiento aparentemente erróneo.

El código al completo

Dos tipos de experimentos permitieron descifrar las palabras específicas del código. El primero implicaba la síntesis de «mini mRNA» constituidos por tan sólo tres nucleótidos. Estos mini mRNA son demasiado cortos para ser traducidos en una proteína, pero inducen la unión de los aminoacil-tRNA a los ribosomas en una especie de intento fallido de traducción. Se puede sintetizar un mini mRNA específico y determinar *qué* aminoacil-tRNA se ha unido a los ribosomas. Por ejemplo, el problema de la combinación G + 2U discutido anteriormente puede resolverse utilizando los siguientes mini mRNA:

GUU, que estimula la unión de valil-tRNA
UUG, que estimula la unión de leucil-tRNA
UGU, que estimula la unión de cisteinil-tRNA

El uso de mini mRNA semejantes permitió descifrar los 64 codones posibles.

El segundo tipo de experimentos que sirvió para descifrar el código implicaba el uso de *copolímeros con repetición*. Por ejemplo, se utilizó el copolímero designado (AGA)*n*, que consiste en una sucesión de nucleótidos AGAAGAAGAAGAAGA, para la síntesis de proteínas *in vitro*. A partir de la secuencia de los polipéptidos resultantes y de los posibles tripletes que pueden darse en el copolímero de RNA, pudieron verificarse muchas de las palabras del código. (Este tipo de experimento se detalla en el Problema 10 de la serie de este capítulo. Al intentar resolverlo, se pondrá en el lugar de H. Gobind Khorana, galardonado con el Premio Nobel por la dirección de estos experimentos).

La Figura 10-27 ofrece el diccionario completo del código genético, compuesto por 64 palabras. Inspeccione este diccionario con cuidado y pondere el milagro de la Genética molecular. Esta labor de inspección debería revelarle varios aspectos que requieren explicaciones adicionales.

Múltiples codones para un solo aminoácido

Como vimos en nuestra discusión sobre la degeneración del código, el número de codones para un aminoácido concreto varía desde uno (triptófano = UGG) hasta seis (serina = UCU, UCC,

Segunda letra

Primera letra	U	C	A	G	
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC Cys UGA Stop UGG Trp	U C A G
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	U C A G
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U C A G
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	U C A G

Figura 10-27. El código genético.

UCA, UCG, AGU o AGC). ¿Por qué? La respuesta es compl[...] pero no difícil de entender; podemos dividirla en dos partes:

1. Algunos aminoácidos pueden ser transportados hasta el ri[...]bosoma por varios tipos (especies moleculares) de tRNA al[...]*ternativos* que contienen anticodones diferentes, mien[...] que otros aminoácidos son transportados hasta el ribos[...] por un solo tRNA.
2. Algunas especies de tRNA pueden incorporar su amino[...]do específico en respuesta a varios codones distintos, no s[...] lo uno, por cierto relajamiento en el emparejamiento entre [...] extremo 3' del codón y el extremo 5' del anticodón. Es[...] emparejamiento algo permisivo se denomina **tambaleo**.

COROLARIO

El grado de degeneración para un aminoácido concreto está determinado por el número de codones para ese aminoácido que cuentan con un tRNA distinto, más el número de codones para dicho aminoácido que comparte[...] un mismo tRNA por el tambaleo.

Es mejor que consideremos primero el tambaleo, ya que [...] nos llevará a discutir las distintas especies de tRNA. El tam[...]leo implica una situación en la que el tercer nucleótido de[...] anticodón (en el extremo 5') no está perfectamente alin[...] (Fig. 10-28). Este nucleótido puede formar puentes de hidróg[...] no sólo con su nucleótido complementario normal en la terc[...] posición del codón sino también con un nucleótido diferen[...] esa posición. Crick estableció una serie de «reglas de tamb[...] que rigen qué nucleótidos pueden formar nuevos enlaces de [...]drógeno mediante tambaleo y cuáles no (Cuadro 10-5). En [...] Cuadro 10-5, la letra I denota inosina, una de las bases raras [...] se encuentran en el tRNA, a menudo en el anticodón.

La Figura 10-28 muestra los codones posibles recono[...] por una de las especies de tRNA para la serina. De acuerdo [...]

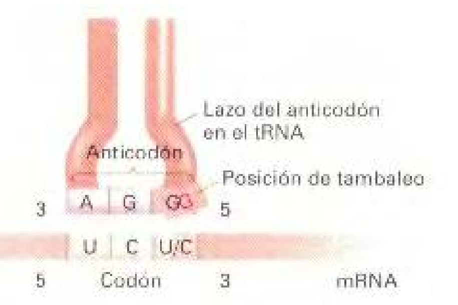


Figura 10-28. En la tercera posición (extremo 5') del anticodón, la G puede adoptar cualquiera de dos posiciones de tambaleo, emparejando así con U o con C. Esto significa que una sola especie de tRNA portador de un aminoácido (en este caso, serina) puede reconocer dos codones distintos —UCU y UCC— en el mRNA.

la regla del tambaleo, la G puede emparejar con U o con C. El Cuadro 10-6 incluye una lista de todos los codones para la serina e indica cómo estos codones pueden ser reconocidos por distintos tRNA.

En algunas ocasiones puede haber una especie adicional de tRNA, que representamos como tRNA$^{Ser}{}_4$, que tiene un anticodón idéntico a uno de los tres anticodones indicados en el Cuadro 10-6 pero difiere en otra parte de su secuencia nucleotídica. Estos cuatro tRNAs se denominan **tRNA isoaceptores** porque aceptan el mismo aminoácido, pero se transcriben a partir de genes diferentes.

Codones de terminación

El segundo detalle que puede que haya notado en la Figura 10-27 es que algunos codones no determinan aminoácido alguno. Estos codones se denominan **codones de parada o codones de terminación**. Pueden considerarse como signos de puntuación, al igual que las comas o los puntos, que indican el fin del mensaje cifrado por el mRNA.

CUADRO 10-5. Emparejamientos codón-anticodón permitidos por las reglas del tambaleo

Extremo 5' del anticodón	Extremo 3' del codón
G	U o C
C	sólo G
A	sólo U
U	A o G
I	U, C, o A

CUADRO 10-6. Distintos tRNA al servicio de los codones para serina

Codón	tRNA	Anticodón
UCU UCC	tRNA^{Ser_1}	AGG + tambaleo
UCA UCG	tRNA^{Ser_2}	AGU + tambaleo
AGU AGC	tRNA^{Ser_3}	UCG + tambaleo

Uno de los primeros indicios de la existencia de codones de parada procede del trabajo realizado en 1965 por Brenner con el fago T4. Brenner analizó ciertas mutaciones (m_1—m_6) en el gen que determina la síntesis de la proteína de la cápsida viral. Estos mutantes presentaban dos cosas en común. En primer lugar, la proteína de la cápsida viral de cada mutante era más corta que la del silvestre. En segundo lugar, la presencia de una mutación supresora (*su*) en el cromosoma de la célula hospedadora tenía como resultado la aparición de una proteína de la cápsida de longitud normal (silvestre) a pesar de la presencia de la mutación *m* (Fig. 10-29).

Brenner examinó los extremos de las proteínas acortadas y los comparó con la proteína silvestre, registrando para cada mutante el aminoácido que *habría* seguido insertándose para continuar con la cadena silvestre. Para los seis mutantes, estos aminoácidos habrían sido glutamina, lisina, ácido glutámico, tirosina, triptófano y serina. Estos resultados no muestran un patrón que resulte inmediatamente obvio, pero Brenner hizo la brillante deducción de que algunos de los codones para cada uno de estos aminoácidos eran similares en cuanto a que podían mutar al codón UAG por cambio de un solo par de nucleótidos en el DNA. Propuso, por tanto, que UAG se interpretaba como un codón de terminación, es decir, como una señal que avisa a la maquinaria de traducción de que la proteína está completa.

UAG fue el primer codón de terminación que se descifró y es conocido como **codón ámbar**. Los mutantes cuyo fenotipo defectuoso se debe a la presencia de un codón ámbar prematuro se denominan *mutantes ámbar*, y a sus supresores se les llama *supresores ámbar*. UGA, el **codón ópalo**, y UAA, el **codón ocre**, son también codones de terminación que cuentan con sus respectivos supresores. Los codones de terminación suelen denominarse **codones sin sentido** puesto que no cifran ningún aminoácido. No es ninguna sorpresa, entonces, que los codones de terminación no funcionen como mini mRNA induciendo *in vitro* la unión de un aminoacil-tRNA a los ribosomas. Más adelante, una vez que hayamos analizado el proceso de síntesis proteica, volveremos a considerar los codones de terminación y sus supresores.

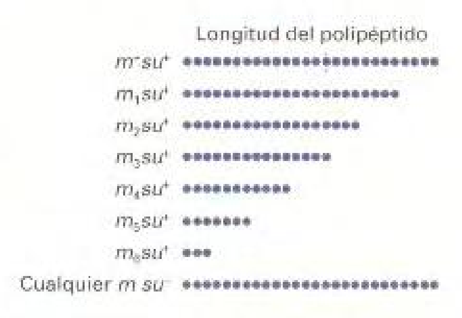


Figura 10-29. Tamaño de las cadenas polipeptídicas de la proteína de la cápsida del fago T4 en la estirpe silvestre (*parte superior*) y en varios mutantes ámbar (*m*). Un supresor ámbar (*su*) conduce a la síntesis de una cadena del mismo tamaño que la silvestre y al desarrollo del fenotipo silvestre.

La síntesis de proteínas

Podemos contemplar la **síntesis proteica** como una reacción química, y esta aproximación es la que utilizaremos en primer lugar. Luego prestaremos atención a las interacciones físicas que ocurren entre los principales componentes de la maquinaria de síntesis.

Cuando se considera la síntesis de proteínas como una reacción química:

1. Cada aminoácido se une a la molécula de tRNA adecuada mediante un enlace rico en energía derivado del ATP. El proceso lo cataliza una enzima específica denominada **sintetasa** (se dice que el tRNA está «cargado» cuando se ha unido a un aminoácido):

$$aa_1 + tRNA_1 + ATP \xrightarrow{\text{sintetasa}_1} aa_1\text{—}tRNA_1 + AMP + PP_i$$

Existe una sintetasa diferente para cada aminoácido.

2. La energía del tRNA cargado se invierte en la formación de un enlace peptídico entre el aminoácido del tRNA y otro aminoácido en el ribosoma:

$$aa_1\text{—}tRNA_1 + aa_2\text{—}tRNA_2 \xrightarrow[\text{en el ribosoma}]{\text{peptidil-transferasa}} \underbrace{aa_1\text{—}aa_2}_{\substack{\text{polipéptido}\\\text{pequeño}}}\text{—}tRNA_2 + tRNA_1 \text{ (liberado)}$$

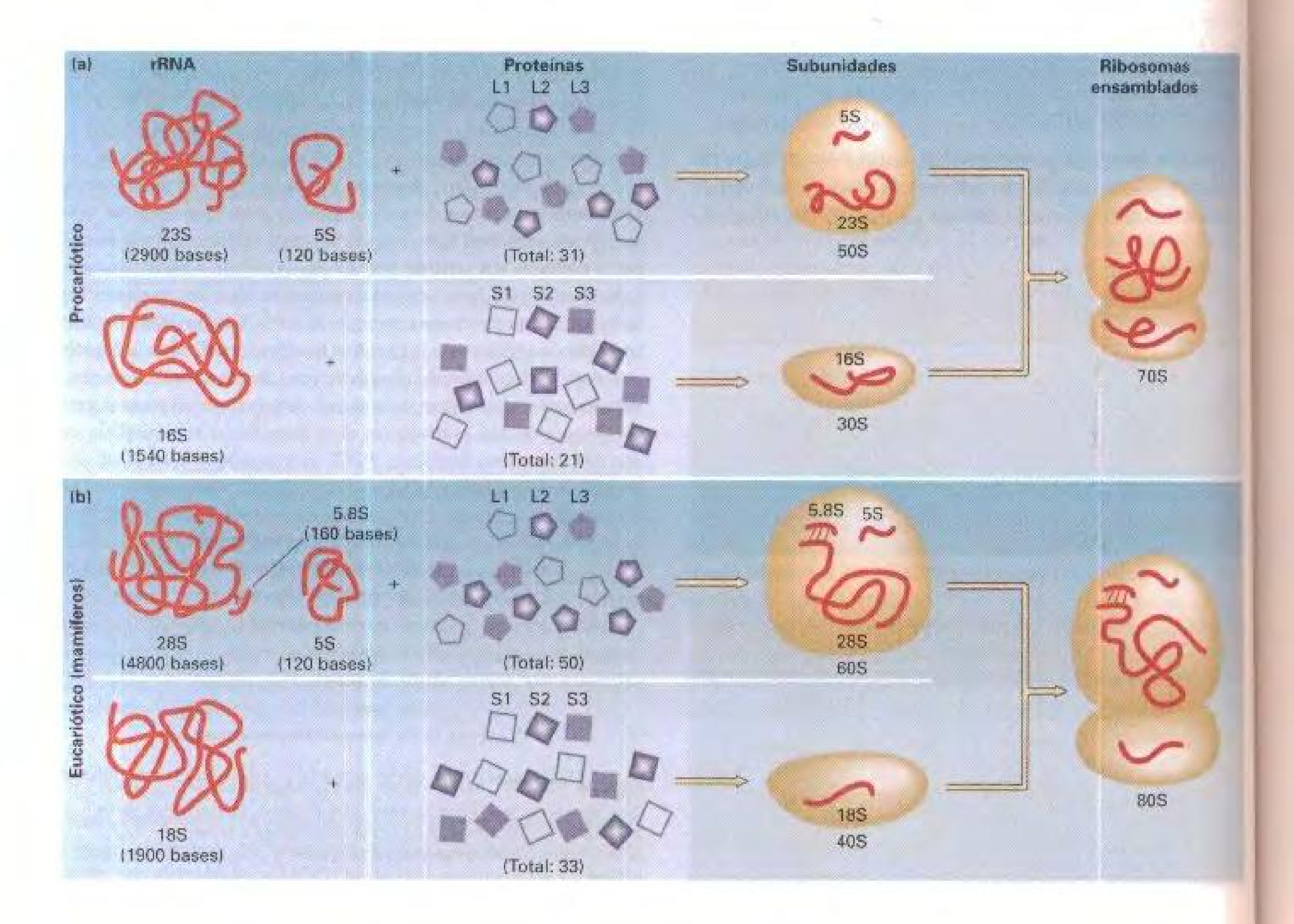
3. Los nuevos aminoácidos se unen a la cadena naciente mediante un enlace peptídico:

$$aa_3\text{—}tRNA_3 + aa_1\text{—}aa_2\text{—}tRNA_2 \longrightarrow \underbrace{aa_1\text{—}aa_2\text{—}aa_3}_{\substack{\text{polipéptido}\\\text{más largo}}}\text{—}tRNA_3 + tRNA_2 \text{ (liberado)}$$

4. Este proceso continúa hasta que se añade el aa_n (el último aminoácido). Por supuesto, el proceso sólo funciona en presencia a la vez de mRNA, ribosomas, varios factores proteicos adicionales, enzimas e iones inorgánicos.

Los ribosomas

Los ribosomas están constituidos por dos subunidades que, en procariotas, sedimentan como partículas de 50S y 30S, que se asocian formando una partícula 70S, como se muestra en la Figura 10-30*a*. En los ribosomas eucarióticos, la subunidad grande



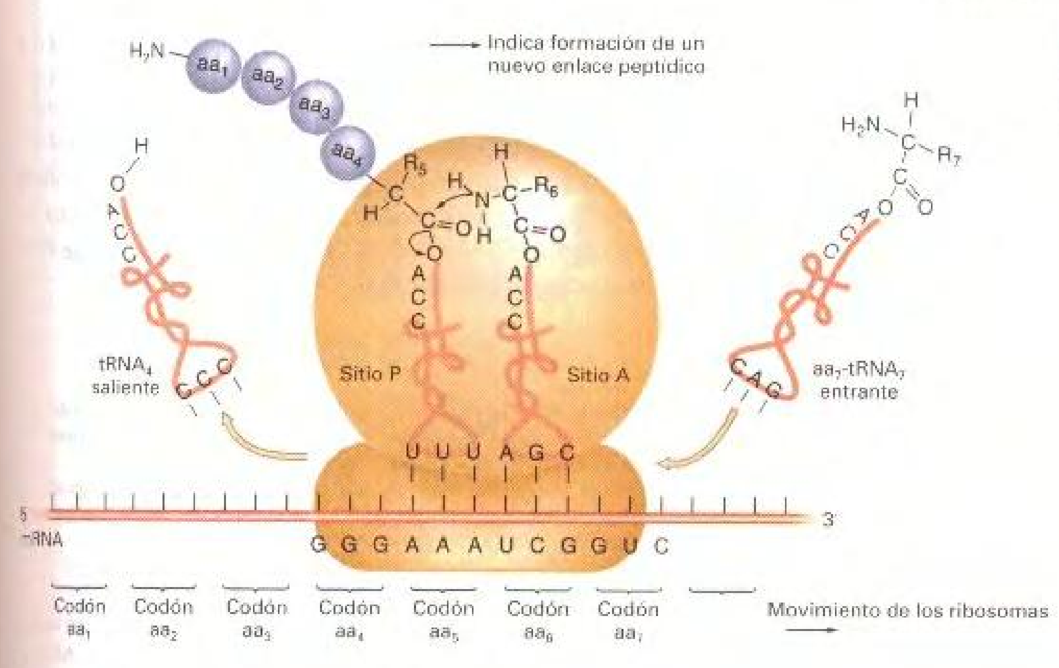


Figura 10-31. Adición de un aminoácido a la cadena polipeptídica creciente durante la traducción del mRNA.

es 60S, la subunidad pequeña 40S y el ribosoma completo 80S (Fig. 10-30*b*). Los ribosomas contienen sitios específicos que les permiten unirse al mRNA, a los tRNA y a otros factores proteicos específicos, todos ellos necesarios para la síntesis de proteínas. Examinemos primero la síntesis de proteínas en el ribosoma desde una perspectiva general y después veremos cada uno de los pasos con más detalle.

La Figura 10-31 muestra la síntesis de un polipéptido en el ribosoma. El mRNA se une a la subunidad pequeña 30S. Los tRNA se unen a dos sitios en el ribosoma que cubren parte de ambas subunidades. El **sitio A** es el punto de entrada para un aminoacil-tRNA (un tRNA portador de un solo aminoácido). El peptidil-tRNA, portador de la cadena polipeptídica creciente, se une al **sitio P**. Cada aminoácido nuevo se añade por transferencia de la cadena creciente al nuevo aminoacil-tRNA, dando lugar a la formación de un nuevo enlace peptídico. El tRNA que ha transferido su aminoácido se disocia entonces del sitio P y el ribosoma avanza hasta el siguiente codón del mensaje, transfiriendo el nuevo peptidil-tRNA al sitio P y dejando vacante el sitio A para el siguiente aminoacil-tRNA entrante.

El proceso de síntesis proteica se divide en tres etapas: **iniciación**, **elongación** y **terminación**. Examinemos cada una de estas etapas con detalle, utilizando como ejemplo a los procariotas.

Figura 10-30. Los ribosomas constan de una subunidad grande y una pequeña. Cada subunidad contiene rRNA de distintas longitudes y un conjunto de proteínas (representadas con diferentes formas y tonos de colores). En todos los ribosomas hay dos moléculas principales de rRNA. (a) Los ribosomas procarióticos contienen además un rRNA de 120 bases que sedimenta a 5S. (b) Los ribosomas eucarióticos contienen dos rRNA pequeños: una molécula de rRNA 5S similar a la procariótica 5S y una molécula de 160 bases que sedimenta a 5.8 S. Las proteínas de la subunidad grande se denominan L1, L2, etc., y las de la subunidad pequeña S1, S2, etc. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright ©, 1995 de Scientific American Books Inc.)

Iniciación

Los tres pasos de la iniciación. Además del mRNA, los ribosomas y las moléculas específicas de tRNA, la iniciación requiere la participación de varios factores denominados **factores de iniciación IF1, IF2 e IF3**. En *E. coli* y en la mayoría de los organismos procarióticos restantes, el primer aminoácido de cualquier polipéptido recién sintetizado es la *N*-formilmetionina. En su incorporación no interviene el tRNA^{Met} sino un **tRNA iniciador** denominado tRNA^{fMet}. Este tRNA iniciador tiene el anticodón normal para metionina pero inserta *N*-formilmetionina en vez de metionina (Fig. 10-32). En *E. coli*, AUG y GUG, y rara vez UUG, funcionan como codones de iniciación. Cuando uno de estos codones aparece en la posición de iniciación, el *N*-formilMet-tRNA lo reconoce y se incorpora *N*-formilmetionina como primer aminoácido de la cadena. Examinemos los pasos con mayor detalle.

1. El primer paso en la iniciación consiste en la unión del mRNA a la subunidad 30S (Fig. 10-33). El factor IF3 estimula dicha unión. Cuando no están ocupadas en la síntesis de proteínas, las subunidades ribosómicas están separadas: su ensamblaje para formar ribosomas completos ocurre como resultado del proceso de iniciación.

2. El factor de iniciación IF2 se une a GTP y al iniciador fMet-tRNA, y estimula la unión del fMet-tRNA al complejo de iniciación, guiando el fMet-tRNA hasta el sitio P, como se muestra en la Figura 10-33.

3. Una de las proteínas ribosómicas hidroliza el GTP unido a IF2, promoviendo así el ensamblaje de las dos subunidades ribosómicas (Fig. 10-33, parte inferior). En este momento, se disocian los factores IF2 e IF3. (Se desconoce cuál es la función exacta de IF1, aunque parece que participa en el proceso de reciclado de los ribosomas).

Metionina

N-Formilmetionina

Figura 10-32. Estructura de la metionina (Met) y de la *N*-formilmetionina (fMet). En procariotas, un tRNA cargado con fMet puede iniciar una cadena polipeptídica, pero no puede incorporarse a una cadena en crecimiento; un tRNA cargado con Met puede insertarse en una cadena en crecimiento, pero no puede iniciar una nueva cadena. Ambos tRNA llevan el mismo anticodón, complementario al codón AUG.

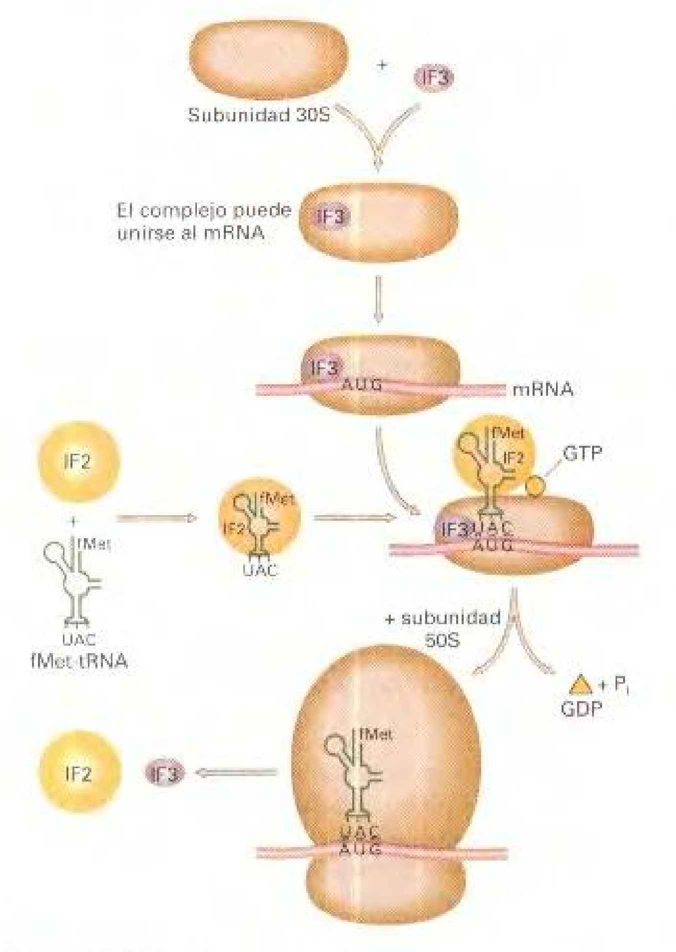


Figura 10-33. Pasos en la iniciación de la traducción (consulte el texto).

AGCACGAGGGGAAAUCUGAUGGAACGCUAC *E. coli trpA*
UUUGGAUGGAGUGAAACGAUGGCGAUUGCA *E. coli araB*
GGUAACCAGGUAACAACCAUGCGAGUGUUG *E. coli thrA*
CAAUUCAGGGUGGUGAAUGUGAAACCAGUA *E. coli lacI*
AAUCUUGGAGGCUUUUUUAUGGUUCGUUCU Proteína A del fago φX174
UAACUAAGGAUGAAAUGCAUGUCUAAGACA Replicasa del fago Qβ
UCCUAGGAGGUUUGACCUAUGCGAGCUUUU Proteína A del fago R17
AUGUACUAAGGAGGUUGUAUGGAACAACGC *cro* del fago λ

Hibrida con el rRNA 16S | Hibrida con el tRNA iniciador

Figura 10-34. Las secuencias de los sitios de unión al ribosoma de *E. coli* y sus bacteriófagos muestran ciertos rasgos en común, que aparecen coloreados en rojo en la figura. El codón de iniciación (en color) está separado unos cuantos nucleótidos de una secuencia corta (en color) que es complementaria al extremo 3′ del rRNA 16S. (Tomado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.)

Sitios de unión al ribosoma. ¿Cómo se seleccionan los codones de iniciación correctos entre los muchos codones AUG y GUG de una molécula de mRNA? John Shine y Lynn Dalgarno fueron los primeros en advertir que los verdaderos codones de iniciación estaban precedidos por secuencias que emparejaban bien con el extremo 3′ del rRNA 16S. La Figura 10-34 muestra algunas de estas secuencias. Entre la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de iniciación existe una separación pequeña pero variable. La Figura 10-35 muestra el emparejamiento entre un mRNA hipotético y el rRNA 16S que, en presencia de fMet-tRNA, promueve la formación de complejos ribosoma-mRNA para el inicio de la síntesis proteica.

Elongación

En la Figura 10.36 se detallan los pasos del proceso de elongación, en los que colaboran tres proteínas, **EF-Tu**, **EF-Ts** y **EF-G**. Los pasos son:

1. El factor de elongación EF-Tu media la entrada de los aminoacil-tRNA al sitio A. Para ello, es necesario que EF-Tu se una primero a GTP. Este complejo EF-Tu-GTP activado se une al tRNA. A continuación, la hidrólisis del GTP a GDP favorece la unión del aminoacil-tRNA al sitio A, en cuyo momento se disocia el factor EF-Tu (Fig. 10-36*a*), dejando el nuevo tRNA en el sitio A (Fig. 10-36*b*).

2. El factor de elongación EF-Ts media la liberación de EF-Tu-GDP del ribosoma y la regeneración de EF-Tu-GTP.

Extremo 3′ del rRNA 16S

3′OH
AUUCCUCCACUAG
5′ GAUUCCUAGGAGGUUUGACCU AUG CGA GCU UUU AGU 3′ — mRNA
fMet — Arg — Ala — Phe — Ser — Polipéptido

Figura 10-35. Unión entre la secuencia Shine-Dalgarno de un mRNA y el extremo 3′ del rRNA 16S. (Tomado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.)

3. En el paso siguiente, la translocación, se transfiere la cadena polipeptídica del peptidil-tRNA al aminoacil-tRNA que ocupa el sitio A, en una reacción catalizada por la enzima peptidil-transferasa (Fig. 10-36*c*). Es entonces cuando el ribosoma se transloca, avanzando un codón en el mRNA, al moverse en dirección 5′ → 3′. Este paso está mediado por el factor de elongación EF-G (Fig. 10-36*d*) y activado por la hidrólisis de GTP a GDP. En el proceso se libera el tRNA descargado del sitio P y se transfiere el peptidil-tRNA recién formado desde el sitio A al sitio P (Fig. 10-36*e*).

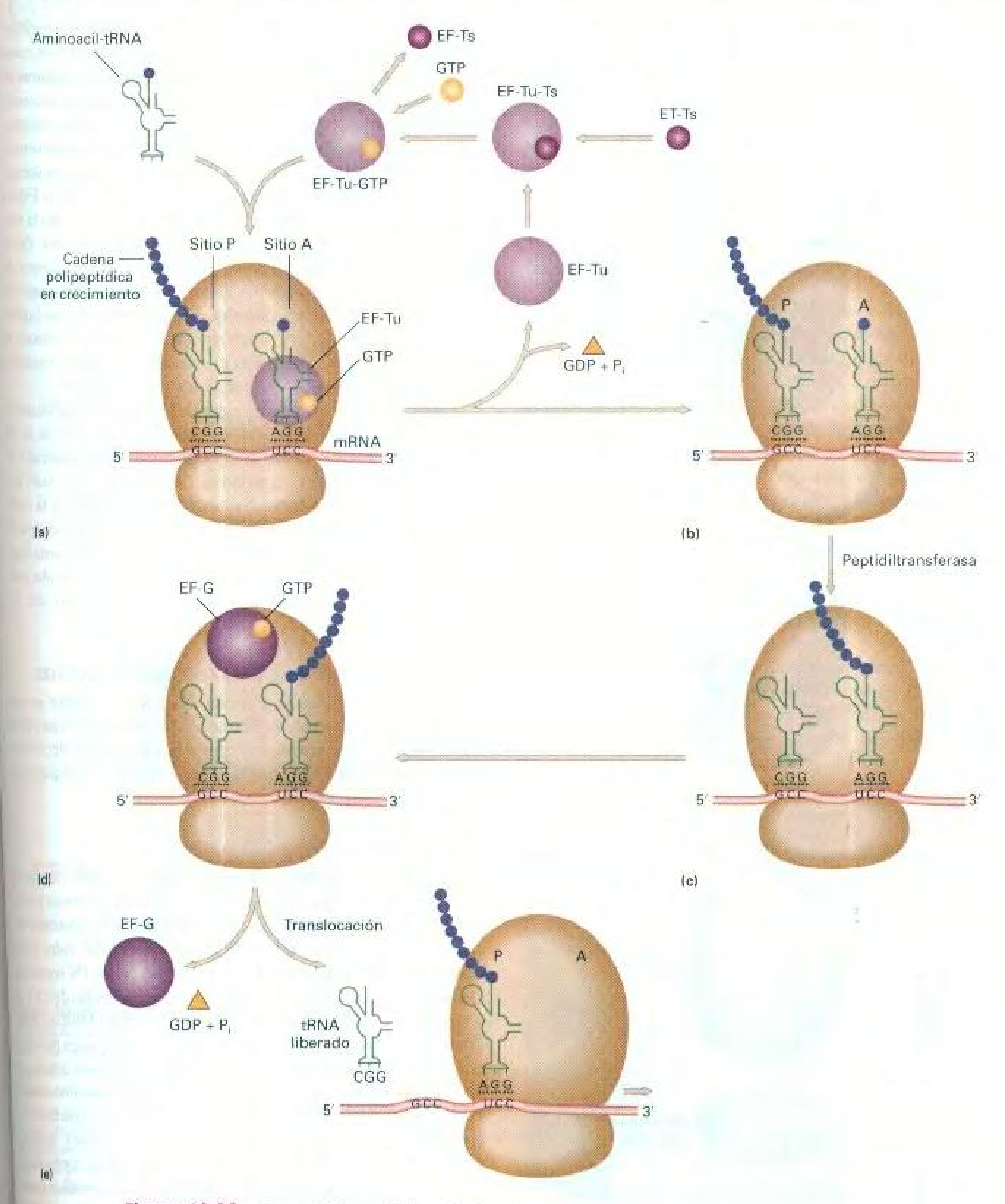


Figura 10-36. Pasos en la elongación (consulte el texto).

Terminación

Factores de liberación. En nuestra discusión previa sobre el código genético, hablamos de los tres codones de terminación de la síntesis proteica, UAG, UGA y UAA. Significativamente, ninguno de los tres codones de terminación son reconocidos por un tRNA, sino por factores proteicos denominados **factores de liberación**, abreviadamente **RF1** y **RF2**. RF1 reconoce los tripletes UAA y UAG, y RF2 reconoce los tripletes UAA y UGA. Existe un tercer factor, **RF3**, que también colabora en la catálisis de la reacción de terminación. Cuando el peptidil-tRNA ocupa el sitio P, los factores de liberación, en respuesta a la presencia de los codones de terminación, se unen al sitio A. El polipéptido entonces se libera del sitio P, y las dos subunidades de los ribosomas se disocian en una reacción favorecida por la hidrólisis de GTP. La Figura 10-37 muestra un esquema del proceso.

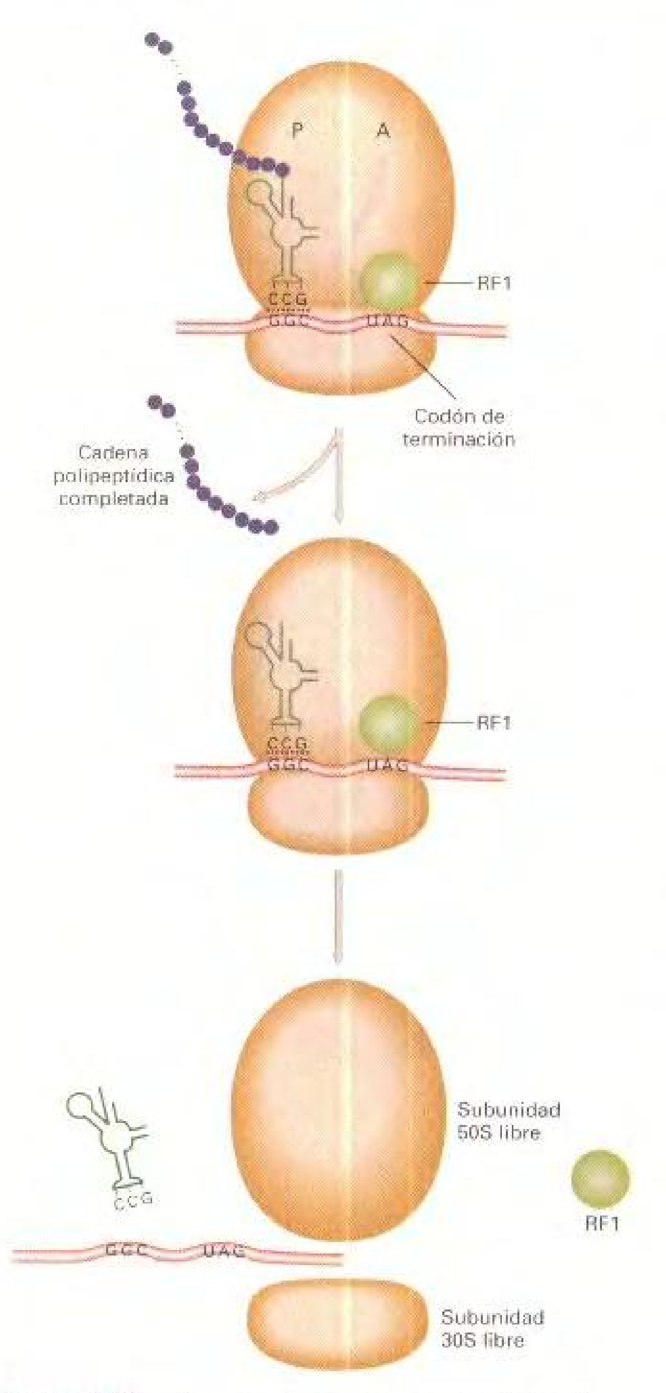


Figura 10-37. Pasos que conducen a la terminación de la síntesis proteica (consulte el texto).

Supresores de las mutaciones sin sentido. Conviene considerar los supresores de mutaciones sin sentido aislados por Brenner y sus colaboradores. Muchas de estas **mutaciones supresoras de fin de mensaje** provocan una alteración en el lazo del anticodón de algunos tRNA específicos, permitiendo que ahora reconozcan una mutación sin sentido en el mRNA. Como consecuencia, se inserta un aminoácido en respuesta al codón de parada prematuro y la traducción no se detiene en este triplete. En la Figura 10-38, se muestra una mutación ámbar que ha provocado la sustitución del codón silvestre por el codón de parada UAG. Por sí mismo, el codón UAG provocaría la terminación prematura de la traducción en esa posición y el consiguiente acortamiento de la proteína. La mutación supresora, en este caso, ha dado lugar a la aparición de un $tRNA^{Tyr}$ con un anticodón que reconoce el codón mutado UAG. Por ello, el mutante suprimido contiene tirosina en la posición correspondiente de la proteína.

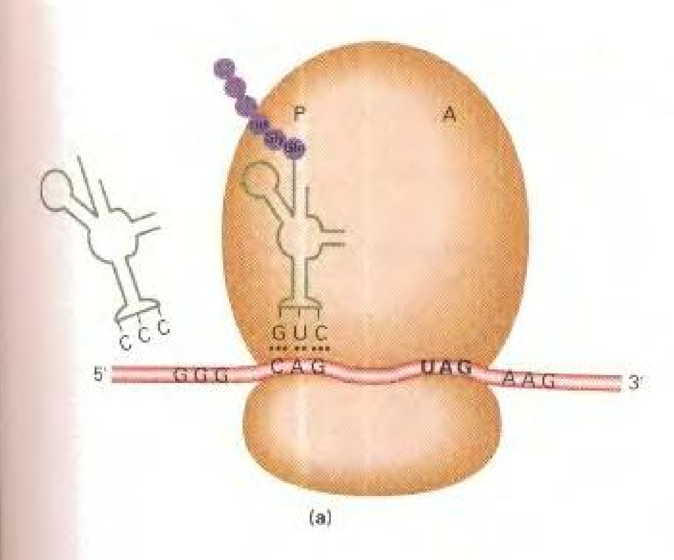
¿Qué sucede con las señales normales de parada, que dictan la terminación correcta de la síntesis proteica, en presencia de un supresor? En muchas de las señales de terminación naturales se encuentran dos codones de terminación consecutivos. Dado que la supresión es un fenómeno bastante ineficaz, debido a la competición con los factores de liberación, la probabilidad de que se supriman dos codones de terminación sucesivos es bastante baja. Por ello, se producen muy pocas proteínas que se hayan alargado como consecuencia de que la traducción prosiga más allá del codón normal de parada.

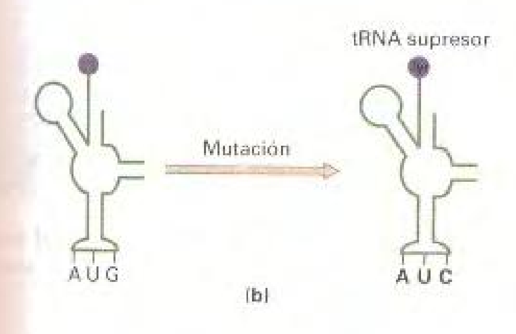
Resumen del proceso de síntesis de proteínas

La Figura 10-39 ofrece un resumen de los pasos tratados en esta sección sobre el proceso de síntesis de las proteínas. Una visión directa de la síntesis proteica la ofrece la micrografía electrónica de la Figura 10-40, que muestra la transcripción y traducción de un gen de *E. coli*.

Procesamiento de proteínas

El procesamiento puede continuar incluso después de que el mRNA se haya traducido en su correspondiente producto proteico. Por ejemplo, las proteínas de membrana o las proteínas secretadas por la célula se sintetizan con un péptido líder corto denominado **secuencia señal**, en el extremo amino (N-terminal). Dicha secuencia señal está constituida por un trecho de 15 a 25 aminoácidos, de los cuales la mayoría son hidrofóbicos. Estos aminoácidos son reconocidos por factores y receptores proteicos que median el transporte a través de la membrana celular; en este proceso, una peptidasa introduce un corte que libera la secuencia señal (Fig. 10-41). (En el caso de algunas proteínas bacterianas que se secretan ocurre un fenómeno similar). Además, varias hormonas peptídicas pequeñas, tales como la corticotropina (ACTH), se producen tras el procesamiento específico de una proteína precursora de mayor tamaño.





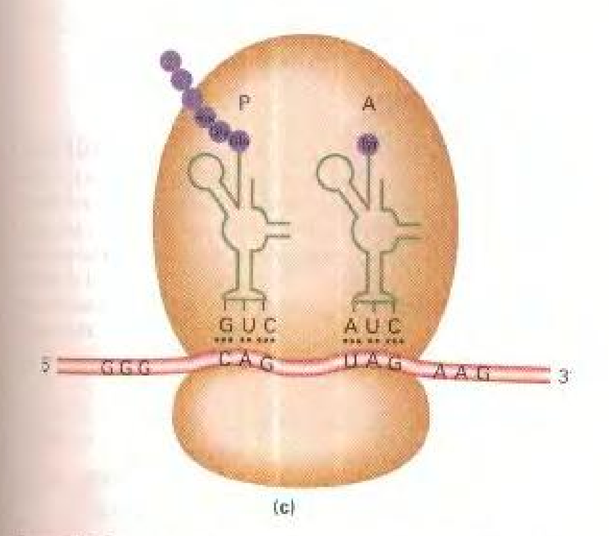


Figura 10-38. (a) Terminación de la traducción. En el ejemplo, la maquinaria de traducción no puede avanzar más allá del codón sin sentido (UAG, en este caso), debido a que no existe ningún tRNA capaz de reconocer el codón UAG. Esto provoca la terminación prematura de la síntesis proteica y la liberación de un polipéptido más corto de lo normal. En el dibujo no se han incluido los factores de liberación. (b) Consecuencias moleculares de una mutación que altera el anticodón de uno de los tRNA de la tirosina, de manera que sea capaz de leer el codón UAG. (c) Supresión del codón UAG por el tRNA alterado, que permite ahora la elongación de la cadena. (Tomado de D. Watson, J. Tooze, y D. T. Kurtz, *Recombinant DNA: A Short Course*. Copyright © 1983 de W. H. Freeman and Company.)

Corte y empalme de segmentos proteicos

Tanto en los procariotas como en los eucariotas se ha observado un fenómeno sorprendente que consiste en la eliminación de segmentos internos de algunas proteínas. Estos segmentos internos se denominan **secuencias proteicas interpuestas** o **IVPS** (del inglés *Intervening Protein Sequence*). El aspecto más destacado de este proceso es que se forma un nuevo enlace peptídico entre las dos secuencias que flanquean la IVPS. La reacción es autocatalítica y puede ocurrir *in vitro*. La Figura 10-42 muestra un esquema del proceso de corte y empalme de proteínas. Curiosamente, todas las secuencias IVPS estudiadas hasta el momento muestran actividad endonucleasa, aunque esta actividad no está relacionada con la reacción de corte y empalme de proteínas.

Universalidad del flujo de la información genética

Hasta ahora, nuestra discusión ha girado en torno a lo que ocurre en los procariotas; lo sorprendente, sin embargo, es que el flujo de información y los procesos de cifrado son virtualmente idénticos en todos los organismos estudiados. Por ejemplo, el código genético deducido a partir de *E. coli* permite explicar satisfactoriamente todos los cambios de un solo aminoácido conocidos en la hemoglobina humana que resultan del cambio de un solo par de nucleótidos (Cuadro 10-7). Tales observaciones sugieren que el código genético es el mismo en todos los seres vivos. Además, una molécula informativa, tal como el mRNA de eritrocito de conejo, que está compuesto mayoritariamente por el transcrito del gen de la hemoglobina, en un ambiente no natural (como el oocito de rana) será traducido en hemoglobina de conejo (Fig. 10-43). Al parecer, la maquinaria de traducción es funcionalmente equivalente en una gama amplia de organismos.

Las técnicas de secuenciación de proteínas, RNA y DNA (véase el Cap. 12) han ratificado que el código genético es universal en todos los organismos estudiados hasta la fecha, desde los virus a las bacterias y los seres humanos. Las mitocondrias son

CUADRO 10-7. Mutaciones y cambios de codones inferidos de las mismas

Proteína*	Cambio de aminoácido	Cambio de codón inferido
Hemoglobina	Glu → Val	GAA → GUA
Hemoglobina	Glu → Lys	GAA → AAA
Hemoglobina	Glu → Gly	GAA → GGA
Sintetasa de triptófano	Gly → Arg	GGA → AGA
Sintetasa de triptófano	Gly → Glu	GGA → GAA
Sintetasa de triptófano	Glu → Ala	GAA → GCA
Proteína de la envoltura del TMV	Leu → Phe	CUU → UUU
Proteína de la envoltura del TMV	Glu → Gly	GAA → GGA
Proteína de la envoltura del TMV	Pro → Ser	CCC → UCC

* Mutaciones de la hemoglobina humana, de la sintetasa de triptófano de *E. coli* y de la proteína de la envoltura del virus del mosaico del tabaco (TMV).
Fuente: L. Stryer, *Biochemistry*, 2.ª ed. Copyright © 198[illegible] de Lubert Stryer.

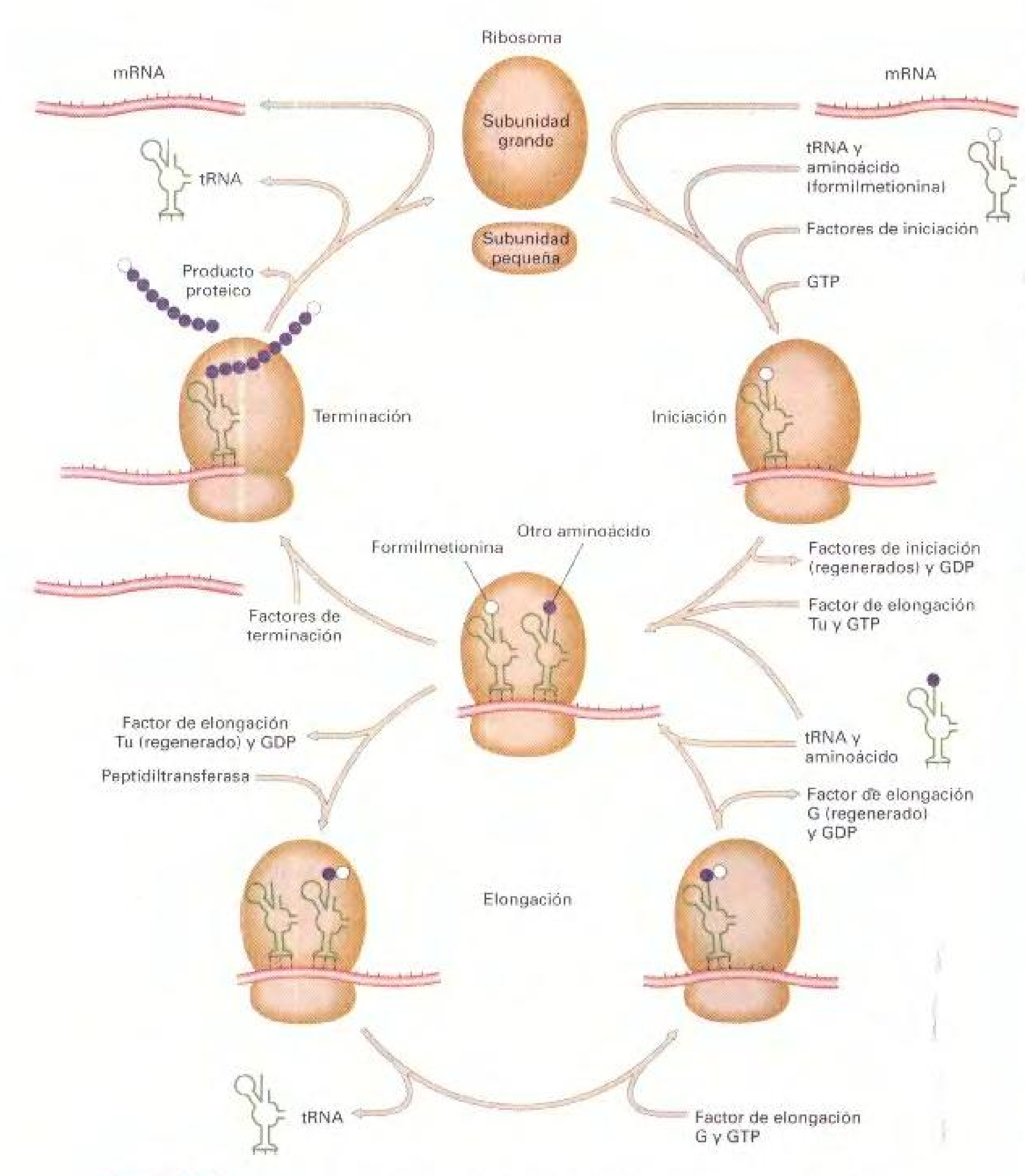


Figura 10-39. Las distintas operaciones que ocurren en el ribosoma. En la iniciación, el ribosoma reconoce la secuencia iniciadora en el mRNA y capta una molécula de tRNA cargada con un solo aminoácido. En todas las proteínas bacterianas, el primer aminoácido es la *N*-formilmetionina. En la elongación, un segundo aminoácido es añadido al primero. El ribosoma se desplaza entonces sobre la molécula de mRNA y el ciclo de elongación se repite. Cuando se alcanza el codón de terminación, la cadena de aminoácidos se pliega espontáneamente para formar la proteína. Seguidamente, el ribosoma se disocia en sus dos subunidades, que se reasocian antes de traducir una nueva molécula de mRNA. En la síntesis de proteínas colaboran varias proteínas catalíticas (factores de iniciación, elongación y terminación) y el trifosfato de guanosina, una pequeña molécula que libera energía al ser transformada en difosfato de guanosina (GDP). (Tomado de D. M. Engleman y P. B. Moore, «Neutron-Scattering Studies of the Ribosome». Copyright © 1976 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

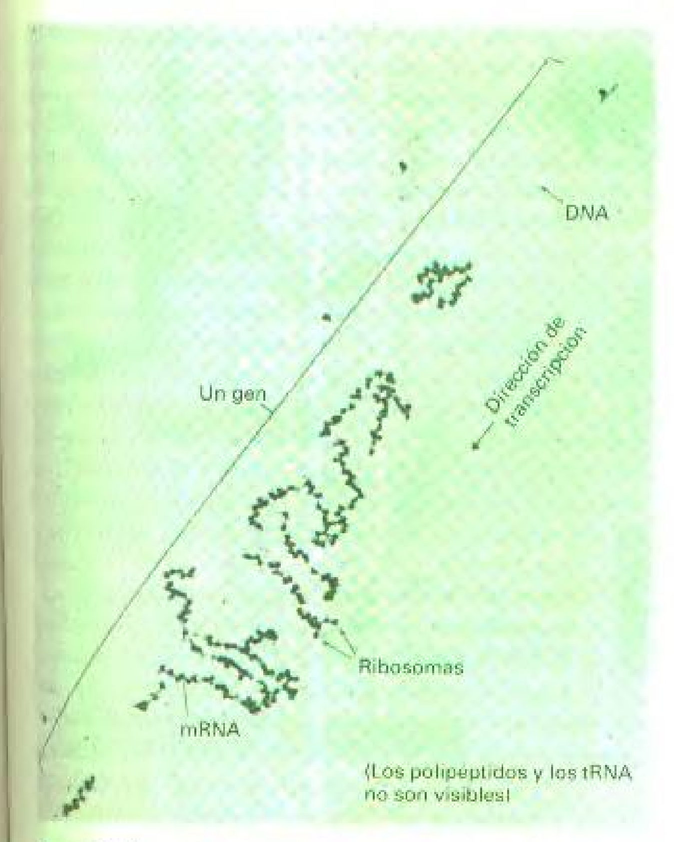


Figura 10-40. Gen de *E. coli* siendo transcrito y traducido de forma simultánea. (Micrografía electrónica de O. L. Miller, Jr., y Barbara A. Hamkalo.)

una excepción (véase también el Cap. 21). En este caso, dos codones se traducen de manera distinta, debido a las características de los tRNA propios del sistema mitocondrial. Así pues, aunque el codón AUA normalmente significa isoleucina, en las mitocondrias se lee como metionina. Además, en las mitocondrias de mamífero, UGA se lee como triptófano, a pesar de que UGA normalmente es un codón de terminación. En las levaduras, las mitocondrias traducen UGA como triptófano, al igual que las mitocondrias de mamífero, pero AUA se lee como isoleucina, como en los sistemas bacterianos (no mitocondriales). Se han encontrado otras excepciones al código universal en el genoma nuclear de algunos protozoos. Como tendremos ocasión de comprobar en el Capítulo 13, a través de ciertos experimentos de Ingeniería genética, el DNA es DNA independientemente de su origen. La naturaleza y el mensaje del DNA representan un lenguaje de vida universal sobre la Tierra.

Esta equivalencia interespecífica de los componentes del aparato genético ¿refleja la existencia de un ancestro evolutivamente común a todas las formas vivas que habitan en la Tierra? ¿O refleja simplemente que ésta es la única opción bioquímica operativa en el ámbito terrestre (predestinación bioquímica)? Cualquiera que sea la respuesta, la maravillosa uniformidad de la base molecular de la vida está firmemente establecida. Existen pequeñas variaciones que no alcanzan a empañar la uniformidad fundamental del mecanismo que hemos descrito.

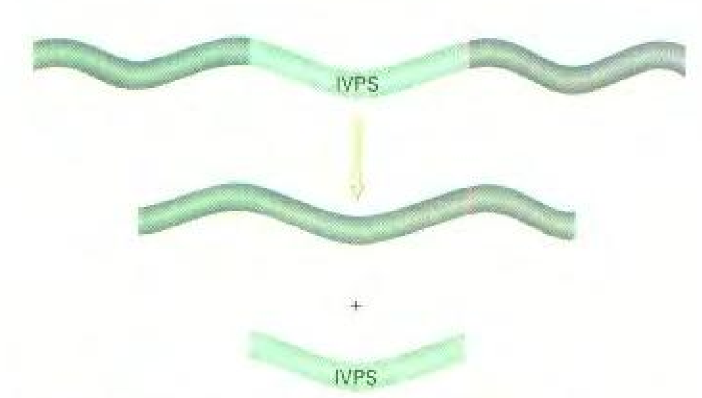
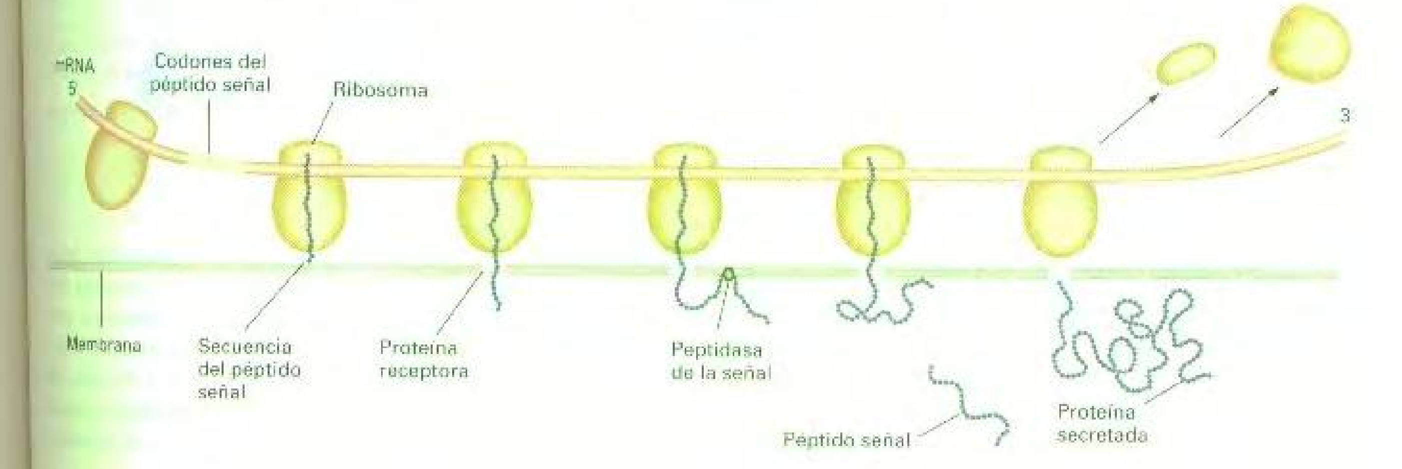


Figura 10-42. El procesamiento de proteínas conduce a la eliminación de un segmento interno (IVPS) y la formación de un nuevo enlace peptídico, que acaba uniendo las dos regiones originalmente adyacentes al segmento eliminado.

Figura 10-41. Secuencia señal. Las proteínas destinadas a ser secretadas al exterior de la célula presentan, en su extremo amino, una secuencia rica en aminoácidos hidrofóbicos. Esta secuencia señal se une a la membrana y arrastra al resto de la proteína a través de la bicapa lipídica. La secuencia señal es eliminada durante este proceso por una enzima denominada *peptidasa de la señal*. (Tomado de J. D. Watson, J. Tooze, y D. T. Kurtz, *Recombinant DNA: A Short Course*, Copyright © 1983 de W. H. Freeman and Company.)



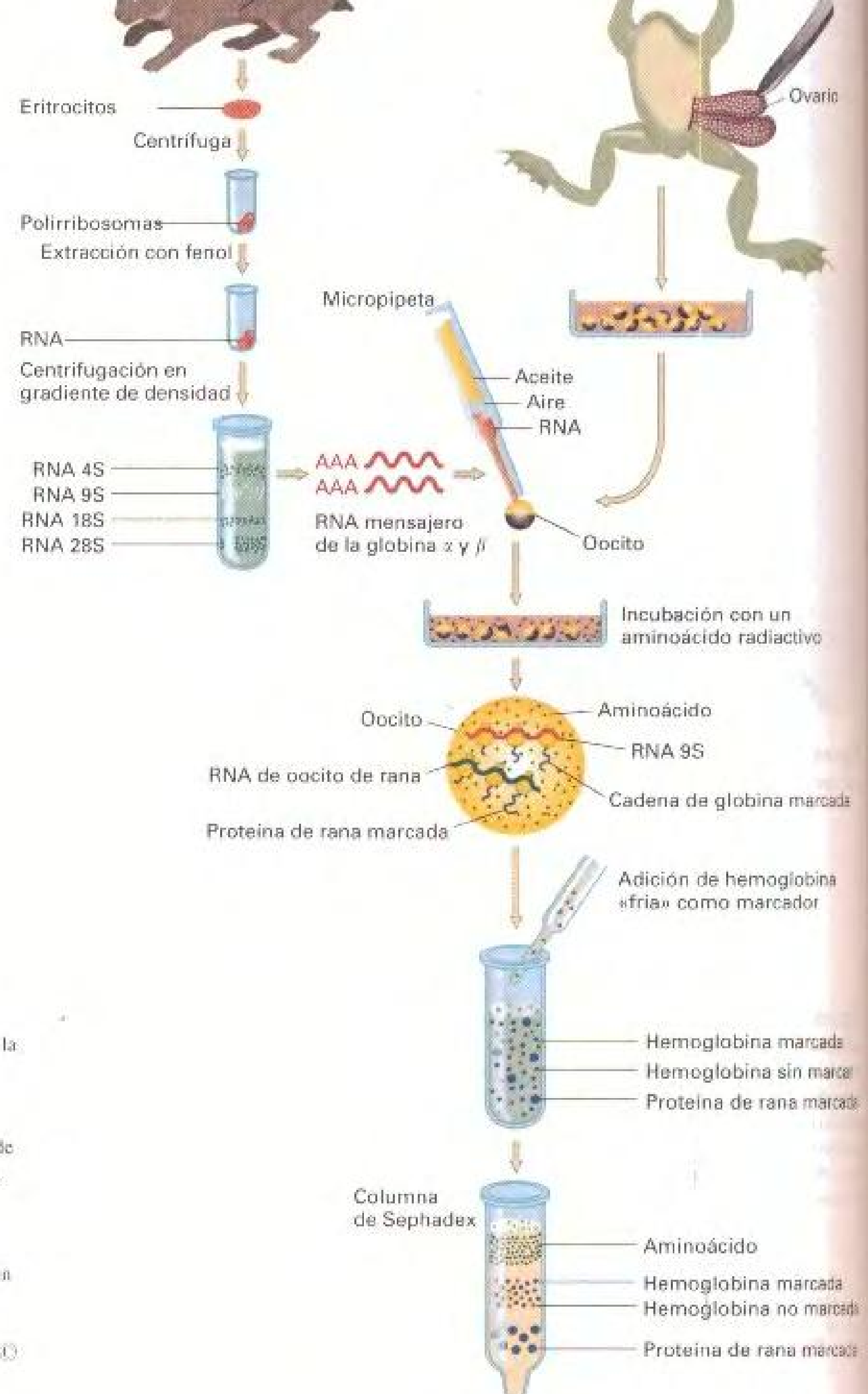


Figura 10-43. Traducción del mRNA de la hemoglobina de conejo en oocitos de rana (*Xenopus*) produce hemoglobina de conejo. Esta traducción la realiza la maquinaria de síntesis de *Xenopus*. Se inyecta el mRNA de la hemoglobina de conejo en un oocito de *Xenopus*, que luego se incuba en presencia de aminoácidos marcados radiactivamente. A continuación, los productos de la traducción se separan en una columna de cromatografía. La hemoglobina del conejo se identifica comparando su posición con la de hemoglobina de conejo no marcada. Este experimento es uno de los tantos que demuestran la uniformidad de los mecanismos moleculares genéticos en todas las formas vivas. (El Sephadex es un material de separación empleado en cromatografía). (Tomado de C. Lane, «Rabbit Hemoglobin from Frog Eggs». Copyright © 1976 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

División funcional del trabajo en el conjunto de genes

¿Qué tipos diferentes de genes son necesarios para construir un organismo? Recientemente, la secuenciación de varios genomas completos ha permitido empezar a vislumbrar la respuesta, de modo que tenemos ya cierta idea sobre las categorías generales de genes y el tamaño relativo de estas categorías. Dos de los organismos eucarióticos para los que se conoce la secuencia completa de nucleótidos son la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae*, que cuenta con más de 6300 genes, y el nematodo *Caenorhabditis elegans*, con más de 19 000 genes. En la levadura, 140 genes determinan rRNA, 40 determinan RNA nucleares pequeños y 275 determinan tRNA (comparados con 877 en el nematodo)

Del total de genes, 6217 en la levadura, y 19 099 en el nematodo, cifran proteínas. El conjunto de genes que determinan proteínas en un organismo se denomina **proteoma**. La división de funciones dentro del proteoma es un tema de considerable interés para la comprensión de qué tipos de genes se necesitan para que un organismo funcione. La comparación de las proteínas predichas por análisis de las secuencias genómicas de la levadura y del nematodo ha puesto de manifiesto un parecido extraordinario entre las proteínas que en ambos organismos cumplen funciones biológicas fundamentales, pero no entre las proteínas específicas de cada organismo. La Figura 10-44 muestra que el número de proteínas implicadas en las tareas biológicas básicas es muy similar en ambos organismos. Por lo tanto, aunque muchos procesos biológicos fundamentales los realizan proteínas muy parecidas en ambos organismos, la gran diferencia observada en el número total de proteínas debe explicarse por la existencia de proteínas que desempeñan funciones específicas de cada organismo.

Los datos obtenidos tras la secuenciación de una porción considerable del genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* han permitido elaborar una visión tentativa del proteoma de una planta, que se representa esquemáticamente en la Figura 10-45.

A partir de tales estimaciones puede empezar a perfilarse vagamente la base genética que sustenta la vida en este planeta, incluyendo la de la especie humana.

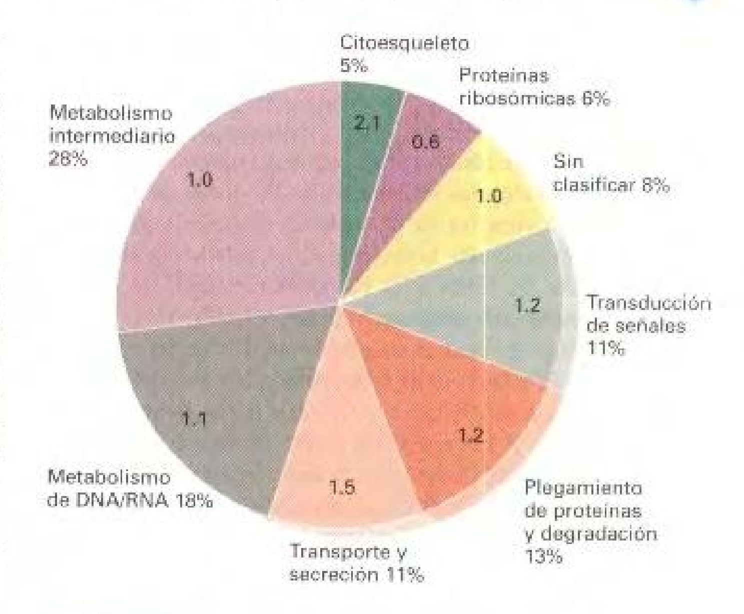


Figura 10-44. Distribución de las funciones biológicas básicas conservadas en la levadura y el gusano. Las secuencias de las proteínas de la levadura y del gusano pueden agruparse en grupos estrechamente relacionados. Cada grupo (incluyendo los grupos con dos o más secuencias) se asigna a una única categoría funcional. La cifra que aparece dentro de cada categoría indica la relación entre el número de secuencias de gusano/levadura para dicha categoría. (Tomado de S. A. Chervitz et al., «Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: orthology and divergence». *Science* 282, 1998, 2022-2028.)

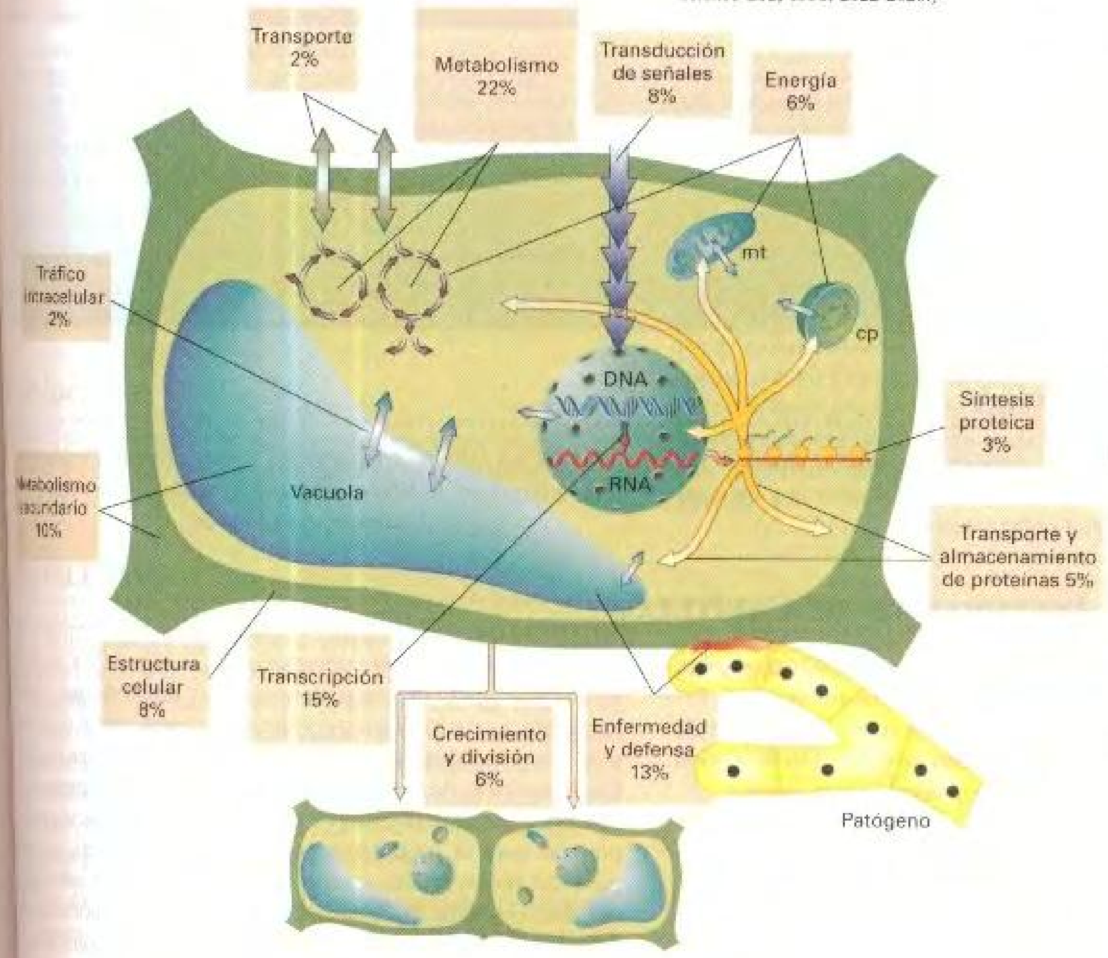


Figura 10-45. Distribuciones de varias categorías de genes que determinan proteínas. La estimación se ha hecho a partir de los genes de la planta *Arabidopsis thaliana* que conocemos en la actualidad. mt, mitocondria; cp, cloroplasto.

RESUMEN

En capítulos anteriores hemos conocido que el DNA es el material genético responsable de dirigir la síntesis de proteínas. El primer indicio sobre cómo el DNA logra esta hazaña proviene de observaciones realizadas en los eucariotas, donde se demostró que el RNA se sintetiza en el núcleo y luego se transfiere al citoplasma. Sin embargo, la mayoría de los detalles de este flujo de información del DNA a las proteínas provienen de experimentos realizados con bacterias y fagos.

Un RNA dado se sintetiza a partir de una sola de las dos cadenas del DNA. Este proceso de transcripción lo cataliza una enzima, la polimerasa de RNA, que sigue unas reglas parecidas a las de la replicación: A empareja con U (en vez de con T, como en el DNA) y G empareja con C. La ribosa es el azúcar utilizado en el RNA. La extracción de RNA de una célula revela la existencia de tres variedades: ribosómico, transferente y mensajero. Los tres tamaños de RNA ribosómico (rRNA) se asocian con una serie de proteínas para formar los ribosomas, las máquinas que llevan a cabo la síntesis de proteínas (traducción). Los RNA transferentes (tRNA) son un grupo de moléculas pequeñas de RNA, con especificidad cada una de ellas por un aminoácido concreto; se encargan de transportar los aminoácidos hasta el ribosoma, donde se añaden a la cadena peptídica en crecimiento.

Las moléculas de RNA mensajero (mRNA) presentan tamaños y secuencias muy distintas. Son las moléculas que contienen la información para la síntesis de proteínas. La secuencia de codones en el mRNA determina la secuencia de aminoácidos del polipéptido correspondiente. Cada codón es específico de un aminoácido, aunque varios codones diferentes pueden cifrar el mismo aminoácido; es decir, el código genético es redundante. Además, hay tres codones para los que no existe ningún tRNA; estos codones indican dónde debe terminar el proceso de traducción.

En los eucariotas, el RNA se procesa antes de ser transportado al citoplasma. Se añaden caperuzas y colas, y se eliminan partes internas del transcrito primario. Así pues, muchos genes eucarióticos están «fragmentados», de manera que las partes informativas del gen no son colineales con el mRNA procesado. El Cuadro 10-8 resume algunas de las diferencias entre la síntesis de RNA en procariotas y eucariotas.

Los procesos de almacenamiento de información, replicación, transcripción y traducción son fundamentalmente similares en todos los seres vivos. Al poner de manifiesto esta similitud, la Genética molecular ha suministrado una poderosa fuerza unificadora a la Biología.

CUADRO 10-8. Diferencias en la expresión génica entre procariotas y eucariotas

Procariotas	Eucariotas
1. Una sola polimerasa de RNA sintetiza las distintas clases de RNA.	1. Tres polimerasas de RNA distintas. De las tres clases de moléculas de RNA, cada una transcribe una clase distinta.
2. El mRNA se traduce a la vez que se transcribe.	2. El mRNA es procesado antes de ser transportado al citoplasma, donde se traduce. Se le añaden caperuzas y colas, y se eliminan regiones internas del transcrito.
3. Los genes son segmentos continuos de DNA, colineales con el mRNA traducido en proteína.	3. Los genes suelen estar fragmentados. No son segmentos continuos de secuencias informativas, debido a la interrupción por secuencias intercaladas (intrones).
4. Los mRNA suelen ser policistrónicos.	4. Los mRNA son monocistrónicos.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, relacionando entre sí tantos de los siguientes términos como le sea posible. Observe que los conceptos no están en ningún orden concreto.

gen / mRNA / tRNA / transcripción / procesamiento / traducción / polimerasa de RNA / ribosoma / codón / anticodón / aminoácido / intrón

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

En el Capítulo 9, consideramos varios aspectos distintos sobre la estructura de las proteínas. Tomando como referencia la Figura 9-8, explique los efectos esperados sobre la actividad de una proteína por una mutación sin sentido, de cambio de sentido y de cambio de fase en el gen que determina la proteína.

♦ Solución ♦

Las mutaciones sin sentido provocan la terminación prematura de la síntesis proteica, de manera que se sintetiza una proteína incompleta. Como puede observarse en la Figura 9-8, un fragmento incompleto de una proteína es muy probable que no pueda adoptar la conformación correcta para constituir el centro activo. Por ello, esperamos que el fragmento proteico sea inactivo. Las mutaciones de cambio de sentido, por otro lado, provocan el cambio de un aminoácido por otro. Si dicho aminoácido es importante para el plegamiento correcto de la proteína, o forma parte del centro activo, o participa en la interacción entre subunidades, entonces el cambio de tal aminoácido normalmente conducirá a la síntesis de una proteína inactiva. Por otro lado, si

el aminoácido se encuentra en la superficie de la proteína y no participa en ninguna de sus funciones, cabe esperar que la mayoría de los cambios en esta posición no repercutan en la actividad de la proteína. Las mutaciones de cambio de fase alteran la fase de lectura, provocando la incorporación de aminoácidos diferentes a los cifrados en la fase correcta. A menos que la mutación de cambio de fase haya ocurrido en un sitio que afecte al extremo final de la proteína, la proteína resultante no podrá plegarse correctamente y carecerá de actividad.

PROBLEMAS RESUELTOS

1. Utilizando el diccionario de codones de la Figura 10-26, indique cómo se vería afectada la traducción por la adición de una adenina al principio de la siguiente secuencia:

```
Ⓐ
↓
-CGA-UCG-GAA-CCA-CGU-GAU-AAG-CAU-
- Arg - Ser - Glu - Pro - Arg - Asp - Lys - His -
```

♦ Solución ♦

Con la adición de una A al principio de la secuencia, la pauta de lectura se desplaza y los aminoácidos especificados por la secuencia cambian, como se muestra aquí. (Observe que aparecen dos codones sin sentido, que provocan la terminación de la cadena).

```
-ACG-AUC-GGA-ACC-ACG-UGA-UAA-GCA-
- Thr - Ile - Gly - Thr - Thr - Stop - Stop -
```

2. La inserción de un solo nucleótido seguida de la deleción de un solo nucleótido a unos 20 nucleótidos de distancia en el DNA provoca cambios en la secuencia proteica de:

—His—Thr—Glu—Asp—Trp—Leu—His—Gln—Asp—

a

—His—Asp—Arg—Gly—Leu—Ala—Thr—Ser—Asp—

¿Qué nucleótido se ha insertado y cuál se ha delecionado? ¿Cuáles serían las secuencias del mRNA original y las del nuevo mRNA? (**Pista:** consulte la Figura 10-27).

♦ Solución ♦

A partir de la secuencia proteica original podemos inferir la secuencia del mRNA (con las consiguientes ambigüedades en este momento):

```
    -His-Thr-Glu-Asp-Trp-Leu-His-Gln-Asp
         U
  U           A    U                  U     A    U
-CA -ACC-GA-  -GA -UGG-CUC-CA  -CA  -GA
  C           G    C         C        C     G    C
         A                   A
         G                   G
                           UUA
                             G
```

Debido a que la inserción de un solo nucleótido provoca el cambio de la secuencia proteica a partir del primer aminoácido (His), podemos inferir que el codón que cifra Thr debe haber cambiado a un codón que cifra Asp. Este cambio debe haberse producido por la adición de una G justo delante del codón que cifra treonina (señalada con un recuadro), provocando un desplazamiento de la fase de lectura, como se indica a continuación:

```
                                                 A
                                                 G
  U             A                                   U
-CA -[G]AC-UGA- GA-(U)UG-G(C)U-UCA-(U)CA↑-GA
  C        (C) (G)    (C)     U   C             C
           (A)                   (A)
            G                     G
- His - Asp - Arg - Gly - Leu - Ala - Thr - Ser - Asp
```

Además, debe haberse producido una deleción de una A o una G en la última posición del penúltimo codón original (indicado con una flecha) para explicar que el último codón vuelva a cifrar Asp. A partir de la secuencia original de la proteína podemos inferir la secuencia del mRNA, aunque con una serie de ambigüedades. Sin embargo, la secuencia de la proteína resultante del cambio de fase nos permite resolver la mayoría de estas ambigüedades. Los nucleótidos que deben aparecer en la secuencia original en estas posiciones están señalados con un círculo. Sólo en algunos casos se mantiene la ambigüedad.

PROBLEMAS

1. Las dos cadenas del material genético del fago λ se distinguen una de otra por su contenido GC. Esta propiedad nos permite separarlas en un gradiente alcalino de cloruro de cesio (la alcalinidad desnaturaliza la doble hélice). Cuando se aísla de células infectadas el RNA sintetizado por el fago λ observamos que hibrida con ambas cadenas del DNA del fago. ¿Qué significado tiene esta observación? Formule algunas predicciones que sean comprobables.

2. Los datos de la siguiente tabla representan las composiciones en bases de dos fuentes de DNA de doble cadena y sus productos de RNA en experimentos realizados *in vitro*.

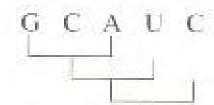
Especies	$\frac{A+T}{G+C}$	$\frac{A+U}{G+C}$	$\frac{A+G}{U+C}$
Bacillus subtilis	1.36	1.30	1.02
E. coli	1.00	0.98	0.80

a. A partir de estos datos, ¿podría determinar si el RNA de estas especies se copia empleando una sola o ambas cadenas del DNA? ¿Cómo? Un dibujo facilitaría la resolución del problema.

b. Explique cómo podría determinar si el RNA es de cadena sencilla o doble.

(El problema 2 se ha reproducido con el permiso de Macmillan Publishing Co., Inc., de M. Strickberger, *Genética*. Copyright © 1968, Monroe W. Strickberger).

3. Antes de que se conociera la verdadera naturaleza del proceso de codificación genética, se propuso que el mensaje podría leerse en tripletes solapados. Por ejemplo, la secuencia GCAUC podría leerse como GCA CAU AUC:



Diseñe un experimento que le permita poner a prueba esta idea.

4. En un sistema de síntesis *in vitro* de proteínas, la adición de un mRNA humano específico a la maquinaria de traducción de *E. coli* (ribosomas, tRNA, etc) estimula la síntesis de una proteína muy parecida a la cifrada en dicho mRNA. ¿Qué nos dice este resultado?

5. ¿Qué anticodón predeciría para una molécula de tRNA portadora de isoleucina? ¿Existe más de una respuesta correcta? Si fuera así, indique las diferentes respuestas posibles.

6. **a.** ¿En cuántos casos del código genético sería incapaz de precisar el aminoácido especificado por un codón si sólo supiera los dos primeros nucleótidos del codón?

b. ¿En cuántos casos sería incapaz de averiguar los dos primeros nucleótidos de un codón si conociera el aminoácido que determina?

7. Deduzca cuáles pudieron ser los seis codones originales mutados en las estirpes de Brenner que le permitieron inferir la naturaleza del codón ámbar UAG.

8. Si un polinucleótido está compuesto por cantidades iguales de las bases adenina y uracilo, dispuestas al azar, ¿qué proporción de sus tripletes determinarán: **(a)** fenilalanina? **(b)** isoleucina? **(c)** leucina? **(d)** tirosina?

9. Se han sintetizado tres RNA distintos, combinando al azar las bases en las proporciones siguientes: **(a)** 1U:5C, **(b)** 1A:1C:4U, **(c)** 1A:1C:1G:1U. Indique la identidad y proporciones de los aminoácidos que se incorporarían a las proteínas sintetizadas *in vitro* al añadir por separado cada uno de estos mRNA. (Consulte la Fig. 10-27).

***10.** Una de las técnicas empleadas para descifrar el código genético fue la síntesis de polipéptidos *in vitro*, a partir de mRNA con secuencias repetidas, por ejemplo, $(AGA)_n$, que puede escribirse como AGAAGAAGAAGAAGA...... En ocasiones, el polipéptido sintetizado estaba compuesto por un solo aminoácido (un homopolímero), y en otros casos por más de uno (heteropolímero), dependiendo de la secuencia repetitiva que se usara. Además, a veces se producían diferentes polipéptidos a partir de un mismo mRNA, lo que sugería que la síntesis de proteínas en el sistema *in vitro* no comenzaba siempre en el nucleótido del extremo del mensajero. Por ejemplo, a partir de $(AGA)_n$ podrían sintetizarse tres polipéptidos: el homopolímero aa_1 (abreviado aa_1-aa_1), el homopolímero aa_2 (abreviado aa_2-aa_2) y el homopolímero aa_3 (abreviado aa_3-aa_3). Probablemente, estos polipéptidos diferentes derivan de la iniciación de la traducción en posiciones distintas de la secuencia:

AGA AGA AGA AGA . . .
GAA GAA GAA GAA . . .
AAG AAG AAG AAG . . .

En la siguiente tabla se muestran los resultados más obtenidos en un experimento realizado por Khorana.

mRNA sintético	Polipéptido(s) sintetizados
$(UC)_n$	(Ser-Leu)
$(UG)_n$	(Val-Cys)
$(AC)_n$	(Thr-His)
$(AG)_n$	(Arg-Glu)
$(UUC)_n$	(Ser-Ser) y (Leu-Leu) y (Phe-Phe)
$(UUG)_n$	(Leu-Leu) y (Val-Val) y (Cys-Cys)
$(AAG)_n$	(Arg-Arg) y (Lys-Lys) y (Glu-Glu)
$(CAA)_n$	(Thr-Thr) y (Asn-Asn) y (Gln-Gln)
$(UAC)_n$	(Thr-Thr) y (Leu-Leu) y (Tyr-Tyr)
$(AUC)_n$	(Ile-Ile) y (Ser-Ser) y (His-His)
$(GUA)_n$	(Ser-Ser) y (Val-Val)
$(GAU)_n$	(Asp-Asp) y (Met-Met)
$(UAUC)_n$	(Tyr-Leu-Ser-Ile)
$(UUAC)_n$	(Leu-Leu-Thr-Tyr)
$(GAUA)_n$	Ninguno
$(GUAA)_n$	Ninguno

[**Nota:** el orden en el que aparecen los polipéptidos o los aminoácidos en la tabla no es significativo excepto en el caso de $(UAUC)_n$ y $(UUAC)_n$.]

a. ¿Por qué $(GUA)_n$ y $(GAU)_n$ determinan cada uno sólo dos homopolipéptidos?

b. ¿Por qué $(GAUA)_n$ y $(GUAA)_n$ no dan lugar a la síntesis de polipéptidos?

c. Asigne un aminoácido a cada triplete de la siguiente lista. Tenga en cuenta que suelen haber varios codones para un solo aminoácido y que las primeras dos letras de un codón son las importantes (mientras que la tercera letra suele ser irrelevante). Recuerde también que algunos codones muy distintos pueden cifrar el mismo aminoácido. Intente resolver la pregunta sin consultar la Figura 10-27.

AUG GAU UUG AAC
GUG UUC UUA CAA
GUU CUC AUC AGA
GUA CUU UAU GAG
UGU CUA UAC GAA
CAC UCU ACU UAG
ACA AGU AAG UGA

La resolución de este problema exige cierta lógica combinada con el método de prueba y error. No se desanime: Khorana recibió el premio Nobel por resolverlo. ¡Buena suerte!

(Problema 10 de J. Kuspira y G. W. Walker, *Genetics Questions and Problems*, McGraw-Hill, 1973.)

11. Suponga que está estudiando un gen de *E. coli* que determina cierta proteína. Parte de su secuencia es:

—Ala—Pro—Trp—Ser—Glu—Lys—Cys—His—

Obtiene una serie de mutantes de este gen que carecen de la actividad enzimática correspondiente. Al aislar las proteínas mutantes, encuentra las siguientes secuencias:

Mutante 1:
—Ala—Pro—Trp—Arg—Glu—Lys—Cys—His—

Mutante 2:
—Ala—Pro—

Mutante 3:
—Ala—Pro—Gly—Val—Lys—Asn—Cys—His—

Mutante 4:
—Ala—Pro—Trp—Phe—Phe—Thr—Cys—His—

¿Cuál es la base molecular de cada mutación? ¿Cuál es la secuencia del DNA que determina esta parte de la proteína?

12. La inserción de un solo nucleótido y la deleción de otro nucleótido a unos 15 nucleótidos de distancia en el DNA provocan cambios en la secuencia proteica de

Lys—Ser—Pro—Ser—Leu—Asn—Ala—Ala—Lys—

a

—Lys—Val—His—His—Leu—Met—Ala—Ala—Lys

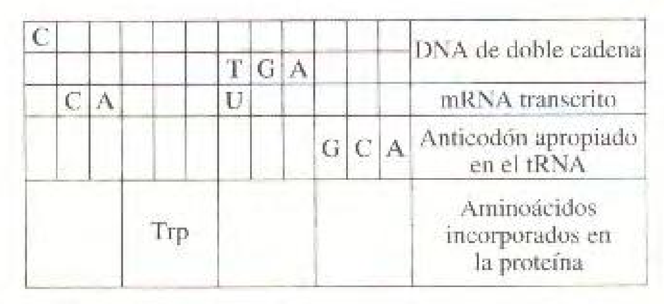
a. ¿Cuáles serían las secuencias del mRNA original y del nuevo mRNA? (Utilice la Fig. 10-26).

b. ¿Qué nucleótido se ha insertado y cuál se ha delecionado?

(El Problema 12 se ha tomado de W.D. Stansfield, *Theory and Problems of Genetics*, McGraw-Hill, 1969.)

13. Se conocen supresores de las mutaciones por cambio de base. Proponga un mecanismo que explique cómo actúan.

14. Utilice el diccionario de codones de la Figura 10-26 para completar la siguiente tabla. Suponga que la lectura ocurre de izquierda a derecha y que, en una misma columna, hay una correspondencia entre la transcripción y la traducción.



C												DNA de doble cadena
						T	G	A				
	C	A				U						mRNA transcrito
									G	C	A	Anticodón apropiado en el tRNA
				Trp								Aminoácidos incorporados en la proteína

15. Un hecho de mutación provoca la inserción de un par de nucleótidos extra en el DNA. ¿Cuál de los resultados siguientes cabría esperar? (1) Que no se produzca proteína alguna; (2) una proteína con un aminoácido cambiado; (3) una proteína con tres aminoácidos cambiados; (4) una proteína con dos aminoácidos cambiados; (5) una proteína en la que están cambiados la mayoría de los aminoácidos situados más allá del punto de inserción.

16. Considere el gen que determina la estructura de la hemoglobina. Ordene los hechos siguientes en el orden cronológico más probable.

a. Aparición de anemia.

b. Alteración del sitio de unión del oxígeno.

c. Aparición de un codón incorrecto en el mRNA de la hemoglobina.

d. El óvulo recibe una dosis alta de radiación.

e. Aparece un codón incorrecto en el DNA del gen de la hemoglobina.

f. Una mujer (que trabaja como técnica de rayos X) entra accidentalmente en una habitación donde está funcionando un generador de rayos X.

g. Muere un niño.

h. La capacidad de transporte de oxígeno del organismo se ve gravemente afectada.

i. El anticodón del tRNA se alinea con un codón mutado y se incorpora un aminoácido erróneo.

j. Se produce el cambio de un par de nucleótidos del DNA del gen de la hemoglobina.

17. A partir de un cultivo de tejido de hámster, se aísla un mutante celular por su resistencia a α-amanitina (un compuesto venenoso extraído de un hongo). Mediante electroforesis, observamos que el mutante ha sufrido una alteración en la polimerasa de RNA; *sólo una* de las bandas electroforéticas aparece en una posición distinta a la de la polimerasa silvestre. Se supone que las células son diploides. ¿Qué nos dice este experimento sobre la posibilidad de detectar mutaciones recesivas en dichas células?

18. Una molécula de DNA de cadena doble, cuya secuencia se muestra a continuación, produce *in vivo* un polipéptido de cinco aminoácidos de longitud.

TAC ATG ATC ATT TCA CGG AAT TTC TAG CAT GTA
ATG TAC TAG TAA AGT GCC TTA AAG ATC GTA CAT

a. ¿Cuál de los dos cadenas del DNA es la que se transcribe y en qué sentido?

b. Marque los extremos 5' y 3' de cada cadena.

c. Si se produce una inversión entre el segundo triplete desde el extremo izquierdo y el tercer triplete desde el extremo derecho, y la cadena que se transcribe es la misma, ¿qué longitud tendrá el polipéptido resultante?

d. Suponga que la molécula original está intacta y que la transcripción utiliza la cadena inferior y se mueve de izquierda a derecha. Indique la secuencia de bases, y señale los extremos 5' y 3' del anticodón que inserta el cuarto aminoácido del polipéptido en crecimiento. ¿Cuál es ese aminoácido?

11

REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN



Imagen del complejo represor *lac*-DNA obtenida por estudios de cristalografía de rayos X.
En este caso, el tetrámero del represor está unido a dos operadores. Cada dímero se une a un operador. Los operadores mostrados aquí (en cian y azul oscuro) tienen una longitud de 21 pares de bases. Los monómeros presentan los colores verde, violeta, rojo y amarillo. Observe cómo el fragmento amino terminal de un monómero (violeta) se cruza con otro monómero (verde) para unirse a la primera parte del operador, mientras que el fragmento terminal del segundo monómero (verde) se cruza y se une a la segunda parte del operador. De esta forma, la hélice de reconocimiento de cada una de las dos subunidades se une a regiones consecutivas del mismo operador. *(Cortesía de M. Lewis, Geoffrey Chang, N. C. Horton, M. A. Kercher, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan y P. Lu, University of Pennsylvania.)*

Ideas fundamentales

La regulación génica está mediada frecuentemente por proteínas que reaccionan ante señales ambientales aumentando o disminuyendo las tasas de transcripción de genes específicos.

En procariotas, la coordinación del control génico se consigue agrupando en el cromosoma genes estructurales coordinados, de forma que se transcriben en moléculas de mRNA multigénicas.

Un ejemplo de control negativo se observa en el sistema *lac*, en el que una proteína represora bloquea la transcripción uniéndose al DNA por un sitio denominado operador.

El control positivo se realiza mediante proteínas que activan la transcripción.

Muchas proteínas reguladoras presentan rasgos estructurales comunes.

En el DNA de los eucariotas existen sitios reguladores adicionales, como los intensificadores, que pueden actuar a una considerable distancia del sitio de inicio de la transcripción, modulando la expresión génica mediante interacción con proteínas reguladoras específicas.

En los Capítulos 9 y 10 hemos considerado qué son los genes y cómo la maquinaria celular los transcribe en moléculas de RNA, muchas de las cuales se traducen a proteínas. Pero, ¿cómo regula la célula la síntesis de sus proteínas? El control de la cantidad de proteínas específicas presentes en la célula es crucial para un organismo. En las células de los organismos superiores, determinados tipos celulares se diferencian y alcanzan un alto grado de especialización. Una célula del ojo humano sintetiza proteínas importantes para el color del ojo, pero no produce las enzimas detoxificadoras que se sintetizan en las células del hígado. Cada tipo celular ha conseguido expresar sólo algunas de sus proteínas.

Las bacterias también necesitan regular la síntesis de sus proteínas. Las enzimas implicadas en el metabolismo de los azúcares constituyen un buen ejemplo. El metabolismo de diferentes fuentes de carbono para obtener energía requiere enzimas metabólicas. Sin embargo, existen muchos tipos diferentes de compuestos que las bacterias pueden usar como fuente de carbono. Azúcares como la lactosa, la glucosa, la maltosa, la ramnosa, la galactosa o la xilosa constituyen sólo una fracción de las posibles fuentes de carbono. Existen varias enzimas diferentes que permiten introducir cada uno de estos compuestos al interior de la célula, y que catalizan los diferentes pasos que llevan a su rotura. Si una célula tuviera que sintetizar simultáneamente todas las enzimas que pudiera necesitar, el coste energético sería demasiado elevado. Por ello, es necesario que la síntesis de estas enzimas esté estrictamente regulada.

Los niveles de las proteínas están regulados por mecanismos que operan durante la transcripción o la traducción. En este capítulo trataremos sobre el control de la transcripción, que es el punto de control principal de regulación. Aunque la regulación de la transcripción es normalmente más compleja en células eucarióticas, algunos de sus aspectos son similares a los de procariotas. Consideraremos primero el control de la transcripción en procariotas y describiremos más tarde la regulación transcripcional en eucariotas.

Circuitos básicos de control

Como acabamos de señalar, el problema básico al que se enfrenta la célula es el de diseñar mecanismos para reprimir la transcripción de todos aquellos genes que determinen enzimas que no son necesarias y para activarlos en el momento en que las enzimas correspondientes sean necesarias. Para conseguir esto se han de cumplir dos requisitos:

1. Las células deben ser capaces de conectar y desconectar la transcripción de cada gen o grupo de genes específicos.

2. Las células deben ser capaces de reconocer las condiciones ambientales según las cuales los correspondientes genes deben ser activados o desactivados.

Revisaremos primero el modelo actual de un caso de control transcripcional en procariotas y consideraremos luego su desarrollo. El primer sistema que analizaremos es el metabolismo de la lactosa en *E. coli*. El detallado análisis genético de este sistema que François Jacob y Jacques Monod realizaron en los años cincuenta supuso el primer avance importante en la comprensión del control transcripcional. Sabemos mucho ahora sobre cómo funciona este sistema. La Figura 11-1 presenta un modelo físico del control de las enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa.

El metabolismo de la lactosa requiere dos enzimas: una permeasa para introducir la lactosa en la célula y una β-galactosidasa para romper la molécula de lactosa en glucosa y galactosa. La β-galactosidasa y la permeasa están determinadas por dos genes contiguos, *Z* e *Y*, respectivamente. Un tercer gen, el gen *A*, determina una enzima adicional, denominada *transacetilasa*, que no se requiere para el metabolismo de la lactosa, por lo que no nos centraremos en ella por ahora. Estos tres genes se transcriben en una única molécula multigénica de RNA mensajero (mRNA). Se desprende de ello que, regulando la producción de ese mRNA, puede regularse coordinadamente la síntesis de las tres enzimas. Un cuarto gen, el gen *I*, cercano pero no directamente adyacente a los genes *Z*, *Y* y *A*, determina una proteína **represora**, llamada

Figura 11-1. Regulación del operón *lac*. El gen *I* produce continuamente represor. El represor se une a la región operadora (*O*), bloqueando a la polimerasa de RNA unida al promotor (*P*), que no puede transcribir los genes estructurales adyacentes. Cuando hay lactosa, ésta se une al represor y cambia su forma, de modo que ya no puede unirse a *O*. La polimerasa de RNA puede entonces transcribir los genes estructurales *Z*, *Y* y *A*, y se producen las tres enzimas.

así porque bloquea la expresión de los genes *Z*, *Y* y *A*. El represor se une a una región del DNA cercana al comienzo del gen *Z* y al sitio donde se inicia la transcripción del mRNA. El sitio del DNA al que se une el represor se denomina **operador**. El represor ha de cumplir la propiedad de ser capaz de reconocer una secuencia de DNA corta y específica, es decir, un operador específico. Esta propiedad garantiza que el represor sólo se una a un sitio del DNA cercano a los genes que controla y no a otros sitios al azar del cromosoma. Al unirse al operador, el represor impide que la polimerasa de RNA inicie la transcripción. Normalmente, la polimerasa de RNA se une a regiones específicas del DNA situadas al comienzo de los genes o grupos de genes llamadas **promotores** (véase Cap. 10), iniciando así la transcripción en los sitios adecuados. El segmento *POZYA* de la Figura 11-1 constituye un **operón**, o unidad genética de expresión coordinada.

El represor *lac* es una molécula con dos sitios de reconocimiento: uno que reconoce la secuencia operadora específica del operón *lac* y otro que reconoce la lactosa y ciertos análogos. Cuando el represor se une a los derivados de la lactosa, sufre un cambio conformacional. Esta ligera alteración de la forma afecta al sitio de unión al operador y ello hace que el represor pierda afinidad por el operador. Así, en respuesta a la unión a los derivados de la lactosa, el represor se suelta del DNA. Se satisface de esta forma el segundo requerimiento de los sistemas de control, la capacidad para detectar las condiciones bajo las cuales merece la pena activar la expresión de los genes *lac*. En sistemas como *lac*, la supresión de la represión se denomina **inducción**; los derivados de la lactosa que inactivan al represor y permiten la expresión de los genes *lac* se llaman **inductores**.

Otros sistemas bacterianos utilizan proteínas *activadoras*, que deben unirse al DNA para activar la transcripción. Existen mecanismos adicionales de control que requieren proteínas que permiten que la transcripción continúe en respuesta a señales intracelulares. Antes de examinar con detalle algunos de estos circuitos reguladores, repasaremos los trabajos clásicos que llevaron inicialmente a describir los sistemas de control bacterianos, ya que constituyen un punto de referencia fundamental del análisis genético.

Descubrimiento del sistema *lac*: control negativo

Jacob y Monod utilizaron el metabolismo de la lactosa en *E. coli* (Fig. 11-2) para abordar el problema de la inducción enzimática (originalmente denominada *adaptación*), es decir, la aparición de una enzima específica sólo en presencia de su sustrato. Este fenómeno era bien conocido en bacterias desde hacía años. ¿Cómo podía una célula «saber» con exactitud qué enzimas debía sintetizar? ¿Cómo un sustrato concreto inducía la aparición de una enzima específica?

En el caso de sistema *lac*, el fenómeno de la inducción puede expresarse de la siguiente manera: en presencia de ciertos galactósidos llamados *inductores*, las células producen unas mil veces más β-galactosidasa, enzima encargada de descomponer β-galactósidos, que en ausencia de esos mismos azúcares. ¿Qué papel desempeña el inductor en el fenómeno de la inducción? Pudiera ser que el inductor simplemente activara un precursor de la

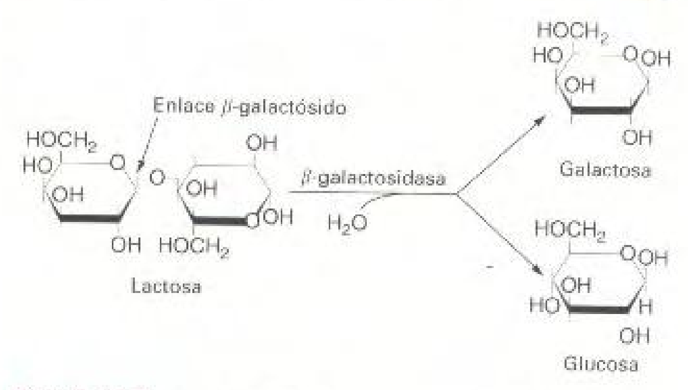


Figura 11-2. Metabolismo de la lactosa. La enzima β-galactosidasa cataliza una reacción en la que se añade agua al enlace β-galactósido para romper la lactosa en galactosa y glucosa. La enzima permeasa de la lactosa es necesaria para el transporte de la lactosa al interior de la célula.

β-galactosidasa, pre-β-galactosidasa, ya presente en la célula. Sin embargo, cuando Jacob y Monod siguieron el destino de ciertos aminoácidos marcados radiactivamente que habían sido añadidos a células en crecimiento, antes o después de añadir el inductor, demostraron que la inducción suponía síntesis de nuevas moléculas de enzima. Estudios cinéticos establecieron que esas moléculas podían detectarse tan sólo tres minutos después de la adición del inductor. Además, si se quitaba el inductor, la síntesis de la enzima se detenía inmediatamente. Era evidente que la célula poseía un mecanismo para conectar y desconectar la expresión de los genes en respuesta a señales ambientales.

Genes que se controlan juntos

Cuando Jacob y Monod indujeron la β-galactosidasa, también indujeron la enzima permeasa, necesaria para el transporte de la lactosa al interior de la célula. El análisis de mutantes indicaba que cada enzima estaba determinada por un gen diferente. También se caracterizó la enzima transacetilasa (que es prescindible y cuya función se desconoce todavía) y posteriormente se demostró que estaba determinada por otro gen distinto, aunque también se inducía junto a la β-galactosidasa y la permeasa. Por tanto, Jacob y Monod identificaron tres **genes controlados coordinadamente**: el gen *Z*, que cifra la β-galactosidasa, el gen *Y*, que cifra la permeasa, y el gen *A*, que cifra la transacetilasa. La cartografía genética indicaba que los tres genes (*Z*, *Y* y *A*) estaban estrechamente ligados en el cromosoma. Estudios posteriores sobre éstos, y otros genes controlados coordinadamente, constataron que en muchos casos se produce una sola molécula de mRNA a partir de una serie de genes contiguos. Un inductor sintético que se usa con frecuencia es el isopropil-β-D-tiogalactósido, o IPTG (Fig. 11-3), un β-galactósido que no es descompuesto por la β-galactosidasa, lo cual permite controlar la concentración del inductor dentro de la célula.

El gen *I*

Análisis genéticos posteriores aclararon otros aspectos del circuito de control. Jacob y Monod caracterizaron un nuevo tipo de

Isopropil-β-D-tiogalactósido
(IPTG)

Figura 11-3. Estructura del IPTG, un inductor del operón *lac*. La β-galactosidasa no rompe el enlace β-D-tiogalactósido. Ello permite manipular la concentración intracelular de este inductor.

mutante, que sintetizaba las tres enzimas a sus máximos niveles, incluso en ausencia del inductor. Por primera vez se había detectado un mutante alterado, no en la *actividad* de una enzima, sino en el control de su *producción*. Estos **mutantes constitutivos** (que mostraban expresión continua desregulada) presentaban mutaciones próximas, pero diferentes, a los genes *Z*, *Y* y *A*, y definían el **locus *I*** como la región que controlaba la inducibilidad de las enzimas *lac*. Las células I^+ sintetizan niveles máximos de las enzimas *lac* sólo en presencia del inductor, mientras que las células I^- lo hacen tanto en presencia como en ausencia del inductor. La Figura 11-4 muestra un esquema de la región *lac* definida por estos experimentos.

El represor

El descubrimiento de factores F′ (véase el Cap. 7) portadores de la región *lac* permitió la construcción de diploides parciales estables y facilitó la realización de pruebas de complementación. Las pruebas con los alelos I^+ e I^- establecieron que I^+ es dominante en *trans* sobre los alelos I^-, lo cual demostró que el producto del gen *I* actuaba a través del citoplasma como un represor. El Cuadro 11-1 muestra el efecto de varias combinaciones de mutaciones, en los estados inducido y no inducido, sobre la producción de β-galactosidasa y permeasa.

Un apoyo experimental al modelo del represor fue la caracterización de las mutaciones I^S. Aunque cartografían en el gen *I*, estas mutaciones impedían la inducción de las enzimas *lac* por la lactosa o por el inductor sintético IPTG (véase la Figura 11-3). Es más, eran dominantes sobre los alelos I^+ e I^- (Tabla 11-2). La mutación I^S elimina la respuesta al inductor, presumiblemente porque altera el sitio de unión estereoespecífico e impide la unión al inductor. Por tanto, incluso en presencia de IPTG, estas moléculas pueden bloquear todavía la síntesis de las enzimas *lac*. Ello explicaría también su dominancia, porque el represor I^S estaría activo, incluso en presencia del represor silvestre que estaría inactivado por el inductor. Las mutaciones I^S apuntan claramente a una interacción directa entre el producto del gen *I* y el inductor.

COROLARIO

La mutación I^- afecta a la *región de unión al DNA* del represor, impidiendo por tanto su unión y permitiendo la transcripción, incluso en *ausencia* del inductor; la mutación I^S afecta a la *región de unión al inductor* del represor, reprimiendo por tanto la transcripción, incluso en *presencia* del inductor.

El operador y el operón

La especificidad del represor, que se traduce en el bloqueo de la síntesis de las enzimas *lac*, sugiere la formación de un complejo estereoespecífico con un elemento que Jacob y Monod denominaron *operador*. Se propuso que el operador era una región de

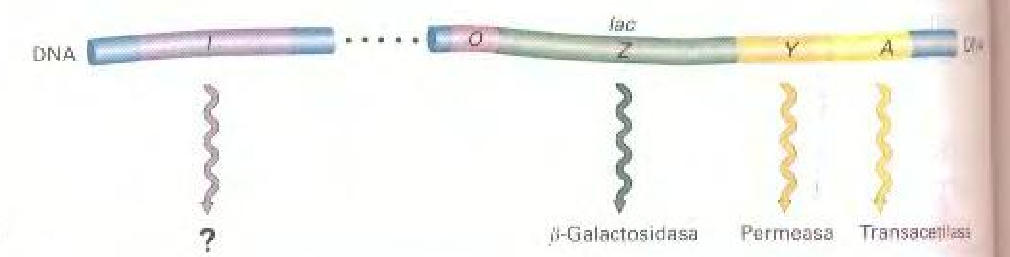


Figura 11-4. El locus *I* controla la inducibilidad de las enzimas *lac*.

CUADRO 11-1. Síntesis de β-galactosidasa y permeasa en estirpes haploides y diploides heterocigóticas portadoras de alelos I^+ e I^-

Estirpe	Genotipo	β-GALACTOSIDASA (Z) No inducida	β-GALACTOSIDASA (Z) Inducida	PERMEASA (Y) No inducida	PERMEASA (Y) Inducida	Conclusiones
1	$I^+ Z^+ Y^+$	−	+	−	+	I^+ es inducible
2	$I^- Z^+ Y^+$	+	+	+	+	I^- es constitutiva
3	$I^- Z^- Y^+/F' I^+ Z^+ Y^+$	−	+	−	+	I^+ es dominante sobre I^-
4	$I^- Z^- Y^+/F' I^+ Z^+ Y^-$	−	+	−	+	I^+ actúa en *trans*

Nota: las bacterias se cultivaron en glicerol (sin glucosa) y fueron inducidas con IPTG. La presencia de niveles máximos de la enzima se indica con el signo «+»; la ausencia o niveles muy bajos, con el signo «−». (Todas las estirpes son O^+.)

CUADRO 11-2. Síntesis de β-galactosidasa y permeasa en la estirpe silvestre y en otras estirpes con diferentes alelos del gen *I*

		β-GALACTOSIDASA (*Z*)		PERMEASA (*Y*)		
Estirpe	Genotipo	No inducida	Inducida	No inducida	Inducida	Conclusiones
1	$I^+ Z^+ Y^+$	−	+	−	+	I^+ es inducible
2	$I^S Z^+ Y^+$	−	−	−	−	I^S está siempre reprimido
3	$I^S Z^+ Y^+/F' I^+$	−	−	−	−	I^S es dominante sobre I^+

Nota: las bacterias se cultivaron en glicerol (sin glucosa) con y sin el inductor IPTG. La presencia de la enzima indicada se representa con el signo «+» y su ausencia, o niveles muy bajos, con el signo «−».

DNA próxima al comienzo del grupo de genes que estaban bajo su control. Los investigadores buscaron mutaciones en el operador que permitieran la síntesis de las enzimas *lac* en presencia de un represor activo. Estas mutaciones deberían ejercer su acción sobre los genes adyacentes a ellas en el operón, un efecto que se conoce como **dominancia en *cis*** (la palabra *cis* significa «adyacente»; el término *trans*, que usaremos a continuación, significa «a través de»). La dominancia normal (***trans***) implica la acción de un producto difusible; la dominancia en *cis* implica la interacción física de un elemento con los genes adyacentes a él. Ningún producto difusible resulta afectado por esta mutación. Seleccionando síntesis constitutiva (no reprimida) en células con dos copias de la región *lac*, para eliminar el efecto de mutaciones sensibles I^-, Jacob y Monod encontraron dichos mutantes, a los que denominaron O^C, de **operador constitutivo**. Como queda indicado en el Cuadro 11-3, las estirpes con este tipo de mutaciones son capaces de sintetizar cantidades máximas de enzima en presencia de IPTG, pero también sintetizan un 10 o un 20 % en ausencia de inductor. Como también se indica en el Cuadro 11-3, las mutaciones O^C son, de hecho, dominantes en *cis*. Los experimentos de cartografía situaron al locus operador entre los genes *I* y *Z*.

Como hemos visto, el segmento *OZYA* constituye una unidad genética de expresión coordinada, que Jacob y Monod llamaron **operón**. La Figura 11-5 muestra un modelo simplificado de operón para el sistema *lac*. Se dice que el operón *lac* está bajo **control negativo** del represor *lac*, ya que éste bloquea normalmente la expresión de los genes *lac* en ausencia de inductor.

Repasemos el modelo de la Figura 11-5, tal como fue propuesto por Jacob y Monod. Los genes *Z* e *Y* cifran las estructuras de dos enzimas necesarias para el metabolismo del azúcar lactosa, la β-galactosidasa y la permeasa, respectivamente. El gen *A* determina la estructura de la enzima transacetilasa. Los tres genes están ligados en el cromosoma. Su transcripción en un (único) mRNA policistrónico proporciona las bases para el control coordinado de la síntesis de mRNA. La síntesis del mRNA poli-

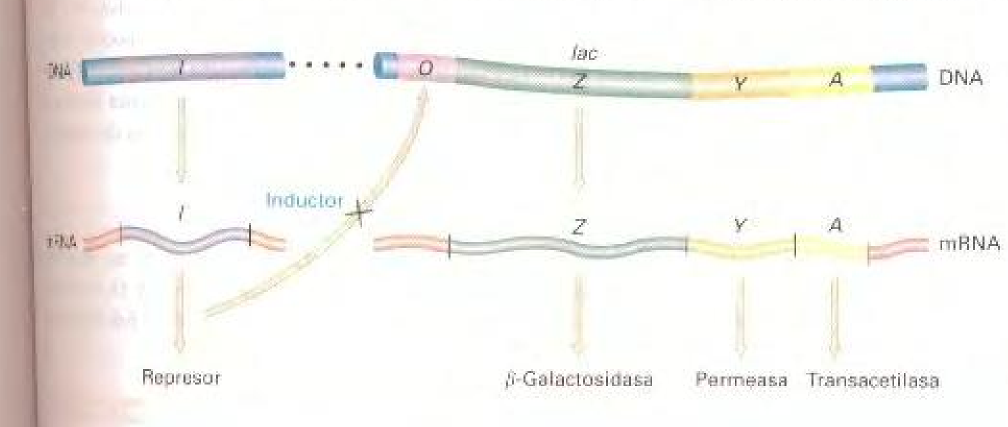


Figura 11-5. Modelo simplificado del operón *lac*. Los tres genes *Z*, *Y* y *A* se expresan coordinadamente. El producto del gen *I*, el represor, bloquea la expresión de los genes *Z*, *Y* y *A* mediante la interacción con el operador (*O*). El inductor inactiva al represor, impidiendo así su interacción con el operador. Cuando esto ocurre, el operón se expresa al máximo nivel.

CUADRO 11-3. Síntesis de β-galactosidasa y permeasa en estirpes mutadas en el operador, haploides y diploides heterocigóticas

		β-GALACTOSIDASA (*Z*)		PERMEASA (*Y*)		
Estirpe	Genotipo	No inducida	Inducida	No inducida	Inducida	Conclusiones
1	$O^+ Z^+ Y^+$	−	+	−	+	La condición silvestre es inducible
2	$O^+ Z^- Y^+/F' O^+ Z^+ Y^-$	−	+	−	+	Z^+ es dominante sobre Z^-
3	$O^C Z^+ Y^+$	+	+	+	+	O^C es constitutivo
4	$O^+ Z^- Y^+/F' O^C Z^+ Y^-$	+	+	−	+	El operador actúa en *cis*

Nota: las bacterias se cultivaron en glicerol (sin glucosa) con y sin el inductor IPTG. La presencia o ausencia de la enzima se indica con los signos «+» y «−», respectivamente. Todas las estirpes son I^+.

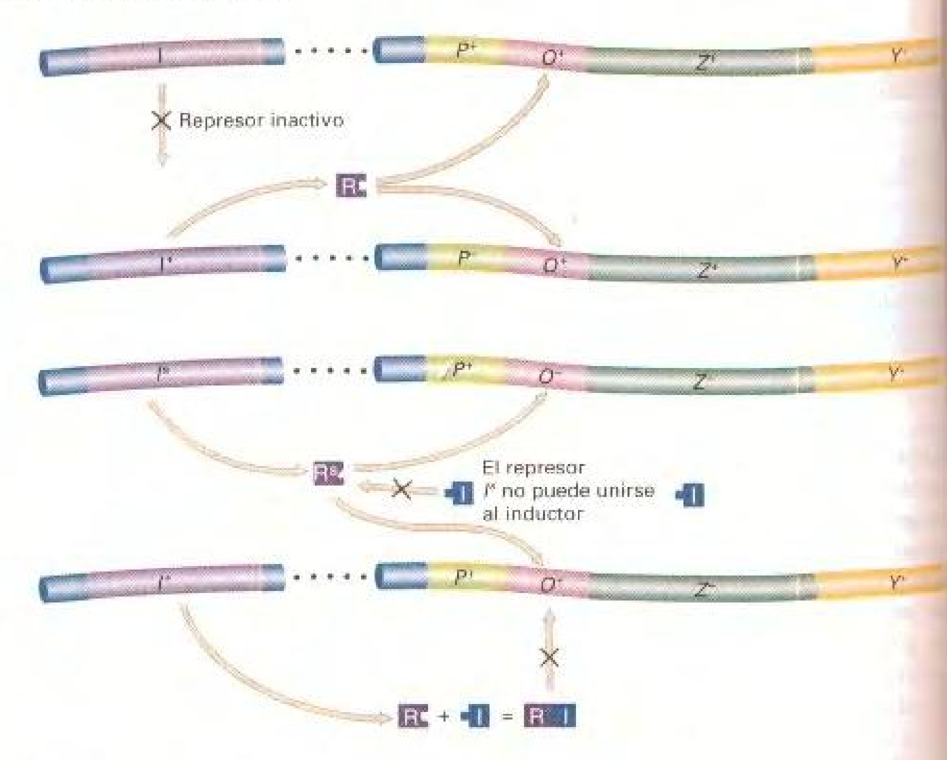


Figura 11-6. La naturaleza recesiva de las mutaciones I^- demuestra que el represor actúa en *trans*. Aunque el gen I^- no sintetiza represor activo, el gen silvestre I^+ proporciona un represor funcional que se une a los dos operadores de una célula diploide y bloquea la expresión del operón *lac* (en ausencia de inductor).

Figura 11-7. La dominancia de las mutaciones I^S se debe a la inactivación del sitio alostérico del represor Lac. En una célula diploide I^S/I^+, ninguno de los genes estructurales *lac* se transcribe, incluso en presencia del inductor. A diferencia de lo que ocurre con el represor silvestre, el represor I^S carece de un sitio funcional de unión a la lactosa (el sitio alostérico) y, por tanto, no se inactiva en presencia del inductor. Así, incluso en presencia del inductor, el represor I^S se une irreversiblemente a todos los operadores de la célula, bloqueando la transcripción del operón *lac*.

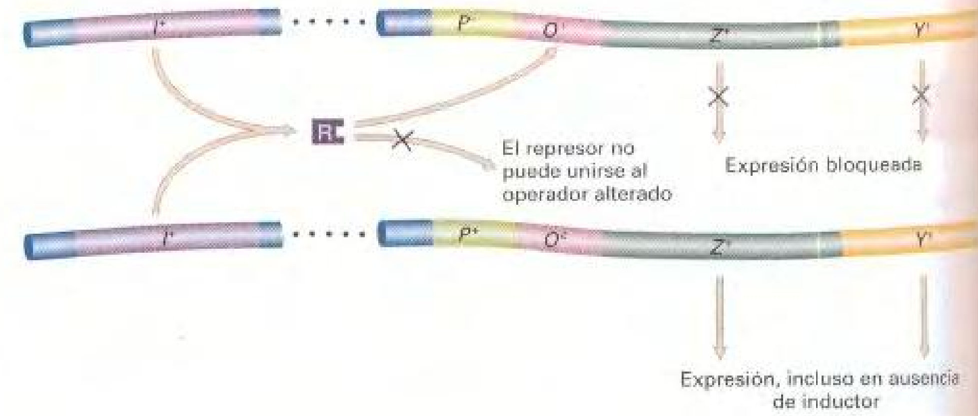
cistrónico *lac* puede bloquearse por la acción de una molécula proteica represora, que se une a una región operadora cercana al sitio de inicio de la transcripción. El represor es el producto del gen *I*. Por tanto, las mutaciones en el gen *I* que impiden la síntesis de un represor funcional provocan la síntesis constitutiva, no reprimida, de las enzimas *lac*. La represión puede suprimirse también por ciertos galactósidos, denominados *inductores*, que inactivan al represor uniéndose a él y alterando su afinidad por el operador. De esta manera, el inductor provoca que el represor se separe del DNA.

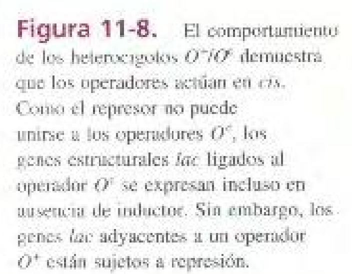
Podemos entender ahora las propiedades de algunos de los diploides utilizados en las pruebas de complementación, a la luz del modelo del operón. La Figura 11-6 muestra cómo las mutaciones I^- son recesivas con respecto al alelo silvestre, porque todo lo que se necesita para sintetizar un represor que pueda unirse a los dos operadores del diploide es un gen *I* funcional. Por otro lado, la Figura 11-7 muestra una célula diploide que contiene una copia del gen *I* silvestre y una copia del gen I^S. La mutación I^S altera el sitio de unión al inductor, de modo que el represor no puede unirse al inductor, aunque todavía
al operador. Estas células diploides son Lac^-, porque el
alterado siempre se unirá al operador, incluso en
inductor, y bloqueará la síntesis de las enzimas *lac*.

Las mutaciones en el operador (O^C) son dominantes
porque sólo son dominantes sobre los genes directamente
a ellas en el mismo cromosoma, como se esquematiza en la
11-8. Así, si una misma célula contiene un operador silvestre
alterado en un segundo cromosoma, el represor reconocerá
rador silvestre y reprimirá a los genes que están ligados a él,
reconocerá al operador alterado. Por tanto, los genes
operador alterado se expresarán incluso en ausencia de

El promotor *lac*

Experimentos genéticos demostraron que existe un
esencial para la transcripción *lac*, situado entre *I* y *O*, en el
delo del operón *lac*. Este elemento, denominado *promotor*




Figura 11-8. El comportamiento de los heterocigotos O^C/O^+ demuestra que los operadores actúan en *cis*. Como el represor no puede unirse a los operadores O^C, los genes estructurales *lac* ligados al operador O^C se expresan incluso en ausencia de inductor. Sin embargo, los genes *lac* adyacentes a un operador O^+ están sujetos a represión.

sirve como sitio de inicio de la transcripción. Las mutaciones en el promotor afectan de igual manera a la expresión de todos los genes del operón. Las mutaciones en el promotor son dominantes en *cis*, como se esperaría de un sitio del DNA que actúa como elemento de reconocimiento para el inicio de la transcripción, ya que los promotores sólo gobiernan la transcripción de los genes adyacentes a él en el operón, en la *misma* molécula de DNA. Como se mencionó en el Capítulo 10, experimentos *in vitro* han demostrado que la polimerasa de RNA se une a la región promotora y que la unión del represor al operador bloquea la unión de la polimerasa de RNA al promotor. Análisis de mutantes, experimentos físicos y comparaciones con otros promotores han identificado en un promotor procariótico típico dos regiones de unión para la polimerasa de RNA. La Figura 11-9 resume toda esta información.

COROLARIO

El operón *lac* es un conjunto de genes estructurales que determinan enzimas que participan en el metabolismo de la lactosa. Estos genes están controlados por la acción coordinada de un promotor y un operador dominantes en *cis*. La actividad de estas regiones está a su vez determinada por una molécula represora especificada por un gen regulador distinto. La Figura 11-1 reúne toda esta información en un solo esquema.

Caracterización del represor *lac* y del operador *lac*

El experimento decisivo fue realizado por Walter Gilbert y Benno Müller-Hill, quienes en 1966 aislaron y purificaron el represor mediante el análisis del componente que se unía al inductor IPTG marcado radiactivamente. Demostraron que el represor es una proteína formada por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales presentaba un peso molecular aproximado de 38 000. Cada molécula contiene cuatro sitios de unión a IPTG (más adelante en este capítulo se describe el represor con más detalle). *In vitro*, el represor se une al DNA que contiene la secuencia del operador y se despega en presencia de IPTG. Gilbert y colaboradores han demostrado que el represor protege ciertas bases específicas del operador contra la acción de reactivos químicos. Estos experimentos proporcionaron pruebas decisivas del mecanismo de acción del represor propuesto por Jacob y Monod.

Gilbert usó la enzima DNasa para degradar el DNA unido al represor. Recuperó fragmentos cortos de DNA que se habían salvado de la actividad enzimática gracias a la protección de la molécula represora, y que presumiblemente constituían la secuencia operadora. Se determinó su secuencia de nucleótidos, y se comprobó que todas las mutaciones definidas como mutaciones en el operador implicaban un cambio en dicha secuencia

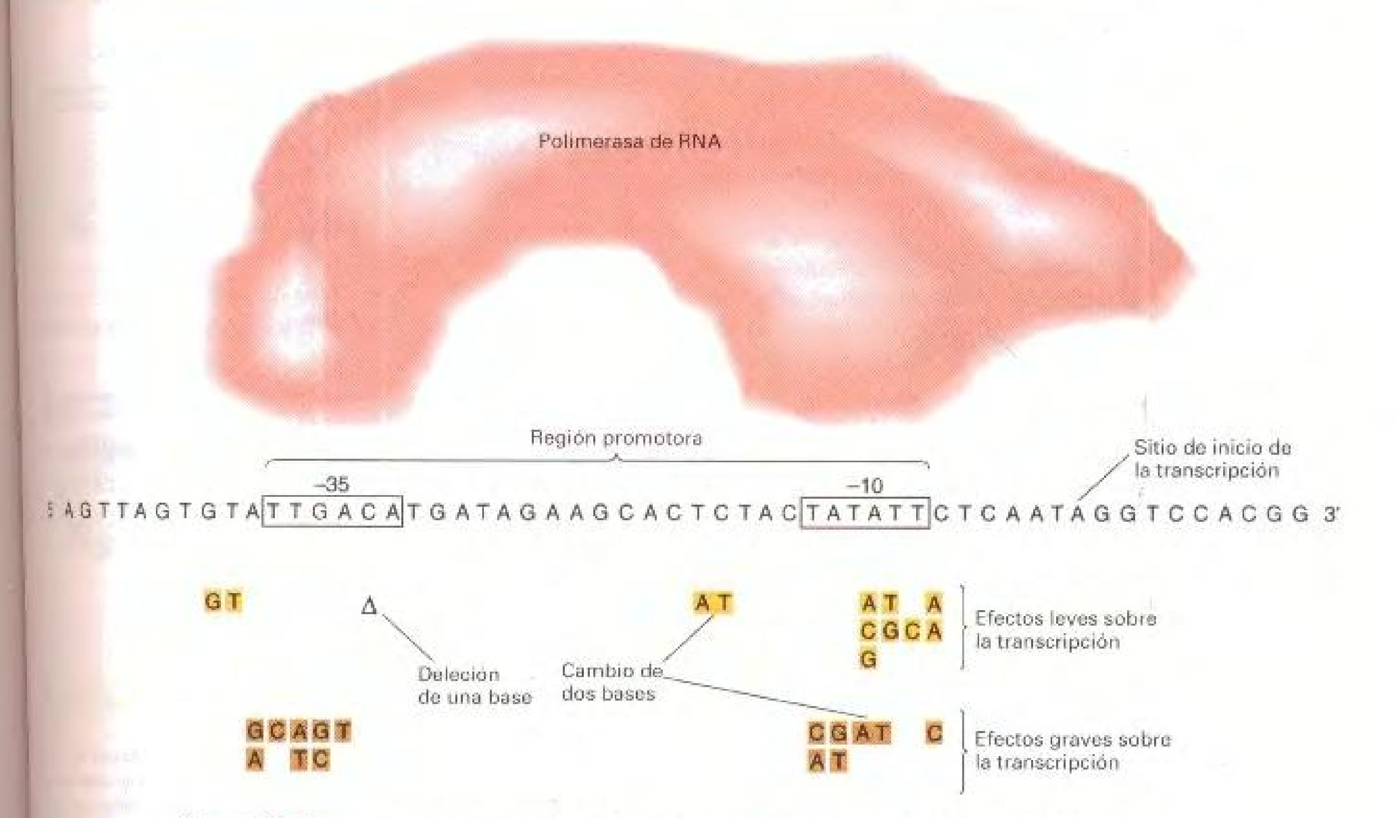


Figura 11-9. Algunas secuencias específicas del DNA son importantes para que la polimerasa de RNA transcriba eficazmente los genes de *E. coli*. Las secuencias encuadradas, situadas aproximadamente 35 y 10 nucleótidos antes del sitio de inicio de la transcripción, están muy conservadas en todos los promotores de *E. coli*, lo que es indicativo de su papel como sitios de contacto en el DNA para la polimerasa de RNA. Mutaciones en esas regiones provocan efectos leves (color dorado) o graves (marrón) sobre la transcripción. Las mutaciones pueden ser cambios de un solo nucleótido o de pares de nucleótidos, o deleciones (Δ). (De J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski y Mark Zoller.)

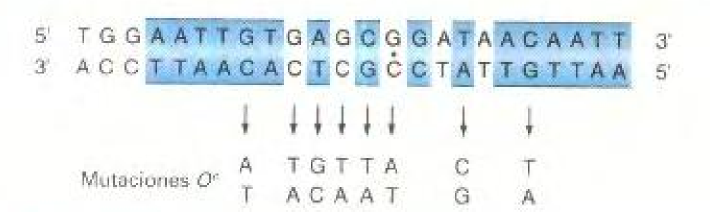


Figura 11-10. Secuencia de bases del operador de la lactosa, y los cambios de bases asociados con ocho mutaciones O^c. Los recuadros coloreados muestran los sitios de doble simetría rotacional y el punto marca su eje de simetría. (De W. Gilbert, A. Maxam y A. Mirzabekov, en N. O. Kjeldgaard y O. Maaløe, eds., *Control of Ribosome Synthesis*. Academic Press, 1976. Utilizada con el permiso de Munksgaard International Publishers, Ltd., Copenhagen.)

(Fig. 11-10). Estos resultados confirman que el locus operador es una secuencia específica de 17 a 25 nucleótidos situada justo antes del gen estructural Z. Muestran también la increíble especificidad del reconocimiento represor-operador, que puede romperse por un simple cambio de base. Cuando se determinó la secuencia de bases del mRNA *lac* (transcrito del operón *lac*), se comprobó que las primeras 21 bases del extremo 5' eran complementarias a la secuencia operadora determinada por Gilbert.

Represión catabólica del operón *lac*: control positivo

Además del sistema represor-operador, existe un sistema de control adicional. Se cree que este sistema ha evolucionado porque las células tienen enzimas específicas que favorecen la entrada y el metabolismo de la glucosa. Si *tanto* la glucosa como la lactosa están presentes en el medio, la síntesis de β-galactosidasa no se induce hasta que toda la glucosa ha sido utilizada. Así, la célula emplea su maquinaria metabólica (que, por ejemplo, induce las enzimas lac) para utilizar primero la glucosa disponible antes de dar los pasos que llevan a la creación de nueva maquinaria para metabolizar la lactosa. El modelo del operón descrito anteriormente no tiene en cuenta la supresión de la inducción por la glucosa, por lo que debemos modificarlo.

Los estudios indican que, de hecho, algún producto del catabolismo de la glucosa (cuya identidad aún se desconoce) impide la activación por lactosa del operón *lac*. A este efecto se le llamó originalmente **represión por el catabolito**. El catabolito de la glucosa actúa sobre un importante constituyente celular: el *monofosfato de adenosina cíclico (AMPc)*.

Cuando la glucosa está presente a altas concentraciones, la concentración de AMPc en la célula es baja; cuando la concentración de glucosa disminuye, la concentración de AMPc aumenta de forma correspondiente. Para que el operón *lac* se active es necesario que haya una alta concentración de AMPc. Los mutantes incapaces de convertir ATP en AMPc no pueden ser inducidos a producir β-galactosidasa, porque la concentración de AMPc no es lo suficientemente alta como para activar al operón *lac*. Existen, además, otros mutantes que producen AMPc y no pueden activar las enzimas *lac*, porque carecen de una proteína, llamada CAP (proteína activadora de los genes catabólicos) determinada por el gen *crp*. La proteína CAP forma un complejo con el AMPc, y este complejo es el que se une al sitio CAP del operón. Unida al DNA, CAP interacciona físicamente con la polimerasa de RNA y, esencialmente, aumenta su afinidad por el promotor *lac*. De esta forma, el sistema de represión por catabolito contribuye a la activación selectiva del operón *lac* (Fig. 11-11).

El control por glucosa se lleva a cabo porque un producto del metabolismo de la glucosa inhibe la formación del complejo CAP-AMPc requerido para que la polimerasa de RNA se una al promotor *lac*. Incluso cuando hay una disminución en el nivel de los catabolitos de la glucosa y se forma el complejo CAP-AMPc, el mecanismo para metabolizar la lactosa sólo se pone en marcha si la lactosa está presente. Este nivel de control se lleva cabo porque los inductores del operón *lac* deben unirse a la proteína represora para separarla del operador y permitir así la transcripción del operón *lac*. De esta forma, la célula conserva su energía y sus recursos, produciendo las enzimas para metabolizar la lactosa sólo cuando son útiles y necesarias. Estos conceptos se resumen en la Figura 11-12, que también muestra la curvatura del DNA que se produce cuando CAP-AMPc se une al sitio CAP, presumiblemente aumentando de esta forma la afinidad de la polimerasa de RNA por el promotor.

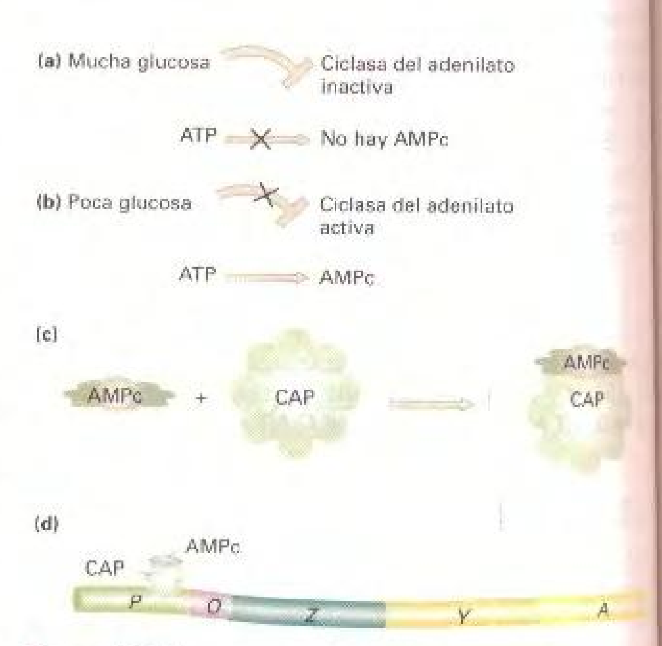


Figura 11-11. Control catabólico del operón *lac*. La inducción del operón por la lactosa es máxima cuando AMPc y CAP forman un complejo. (a) Cuando hay mucha glucosa, uno de sus productos catabólicos inhibe a la enzima ciclasa del adenilato, impidiendo la conversión de ATP en AMPc. (b) Cuando hay poca glucosa, no hay producto catabólico, la ciclasa del adenilato está activa y se forma AMPc. (c) Cuando hay AMPc, éste actúa como un efector alostérico, formando un complejo con CAP. (d) El complejo AMPc-CAP actúa como un activador de la transcripción del operón *lac*, uniéndose a una región del promotor *lac*. (CAP = proteína activadora de los genes catabólicos; AMPc = monofosfato de adenosina cíclico.)

COROLARIO

El operón *lac* es objeto de un sistema de control adicional que hace que el operón permanezca inactivo en presencia de glucosa, incluso cuando la lactosa está presente. Concentraciones altas de catabolitos de la glucosa dan lugar a bajas concentraciones de AMPc, que debe formar un complejo con CAP para que se produzca la inducción del operón *lac*.

Control positivo y negativo

El control por el represor y el inductor del operón *lac* es un ejemplo de **control negativo**, en el cual la expresión está normalmente bloqueada. Por el contrario, el sistema CAP-AMPc es un ejemplo de **control positivo**, porque la expresión del operón *lac* requiere la *presencia* de una señal activadora —en este caso, la interacción del complejo CAP-AMPc con su región de unión en el DNA. La Figura 11-13 ilustra las diferencias entre estos tipos básicos de sistemas de control.

Para que las proteínas activadoras o represoras ejerzan su función, cada una debe poder existir en dos estados: uno en que pueda unirse a su diana en el DNA, y otro en que no pueda hacerlo. Este estado debe ser el apropiado a una serie concreta de condiciones ambientales. En el caso de muchas proteínas activadoras o represoras, el modo en que se regula su unión al

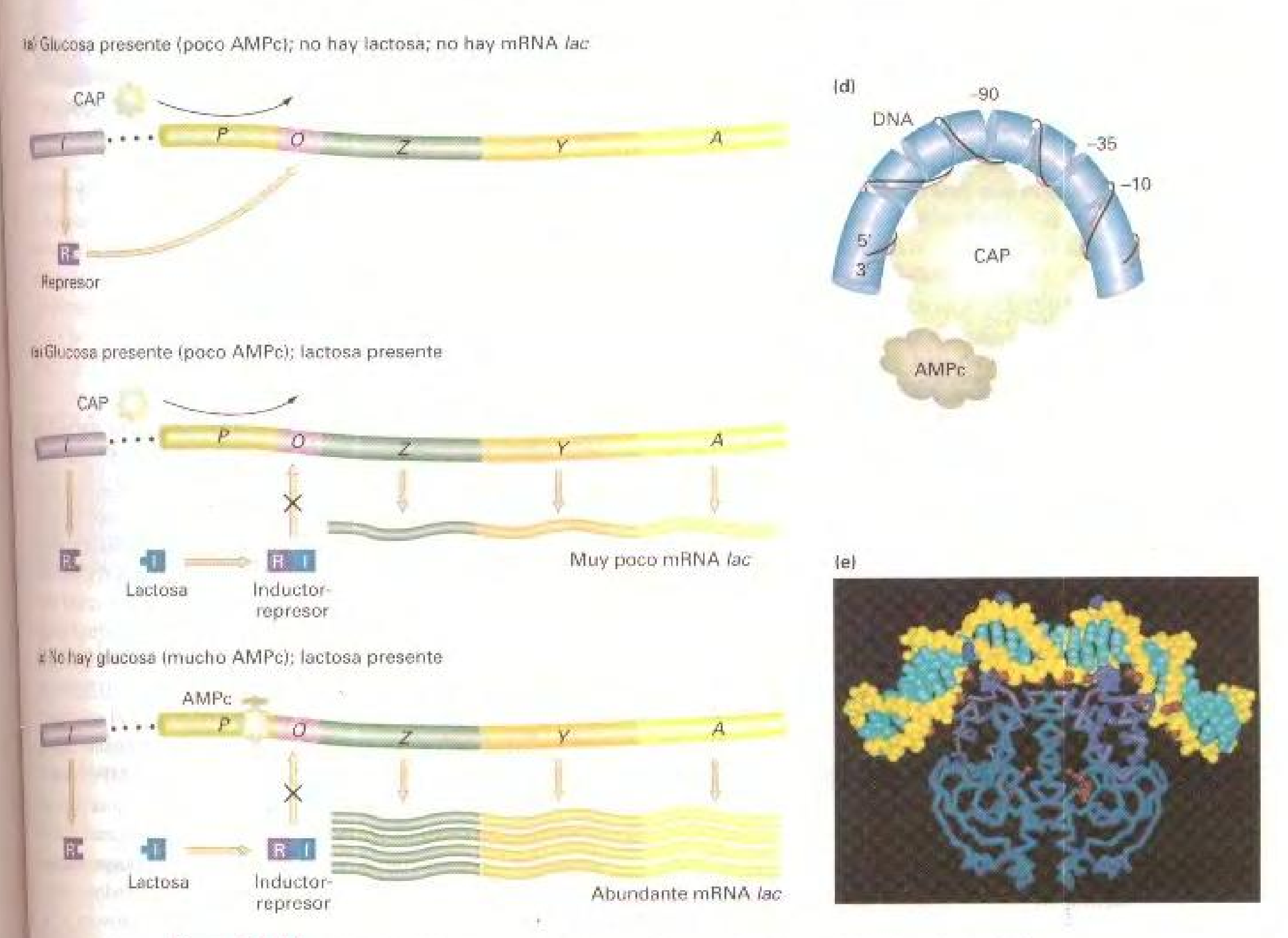
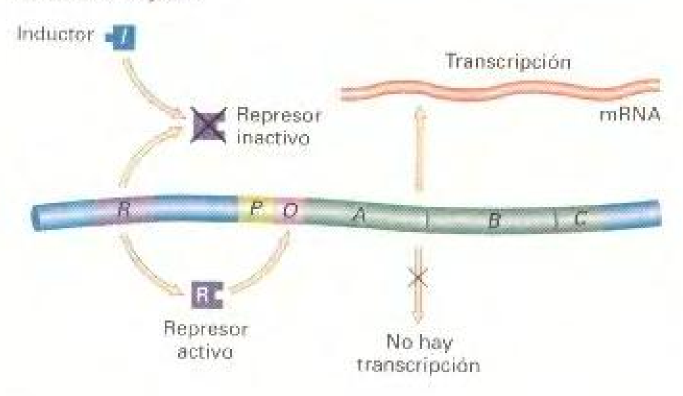


Figura 11-12. Control negativo y positivo del operón *lac* por el represor Lac y la proteína activadora de los genes catabólicos (CAP), respectivamente. (a) En ausencia de lactosa, que sirve como inductor, el represor Lac se une al operador. Independientemente de los niveles de AMPc y de la presencia de CAP, la producción de mRNA está bloqueada. (b) Cuando está presente la lactosa, ésta se une al represor, que ya no puede unirse al operador; sin embargo, sólo se producen pequeñas cantidades de mRNA porque la presencia de glucosa mantiene bajos los niveles de AMPc, y por tanto, no se forma ni se une al promotor el complejo CAP-AMPc. (c) Cuando el represor está inactivado por la lactosa y hay altos niveles de AMPc (debido a la ausencia de glucosa), el AMPc se une a CAP. El complejo AMPc-CAP se une entonces al promotor, el operón *lac* se activa y se producen grandes cantidades de mRNA. (d) Cuando CAP se une al promotor, genera una curvatura de más de 90° en el DNA. Aparentemente, la polimerasa de RNA se une con mayor eficacia cuando el promotor adquiere esta configuración curvada. (e) CAP unido a su sitio de reconocimiento en el DNA. Esta imagen está obtenida mediante el análisis estructural del complejo CAP-DNA. [Partes a-d modificadas de B. Gartenberg, y D. M. Crothers, *Nature* 333, 1988, 824. (Véase H. N. Lie-Johnson et al., *Cell* 47, 1986, 995.) Adaptado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995, Scientific American Books. Parte e de L. Schultz y T. A. Steitz.]

DNA depende de la interacción de dos sitios diferentes en la estructura tridimensional de la proteína. Uno de ellos es el dominio de unión a DNA. El otro, el **sitio alostérico**, actúa como un interruptor que dispone al sitio de unión al DNA en uno de dos posibles estados: funcional o no funcional. El sitio alostérico interacciona con pequeñas moléculas llamadas efectores alostéricos. En el caso del operón *lac*, los inductores *lac* son los efectores alostéricos. Cuando éstos se unen al sitio alostérico, provocan un cambio conformacional en la proteína reguladora que altera la estructura del dominio de unión al DNA. Algunas proteínas represoras o activadoras deben unirse a su efector alostérico para ser capaces de unirse al DNA. Otras sólo pueden unirse al DNA en ausencia de su efector alostérico. La Figura 11-14 ilustra estos conceptos.

Empleando diferentes combinaciones de elementos controladores, las bacterias han desarrollado numerosas estrategias para regular la expresión de sus genes. A continuación se explican algunos ejemplos.



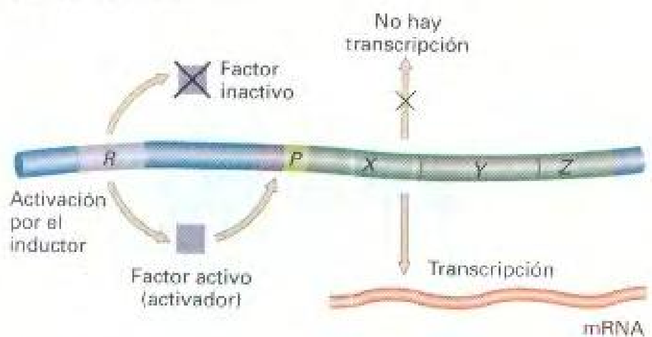


Figura 11-13. Comparación entre control positivo y negativo. Se muestran los aspectos básicos de ambos tipos de control. (a) En el control negativo, un represor activo (cifrado en el gen *R* en este ejemplo) bloquea la expresión de los genes del operón *A B C* uniéndose al sitio operador (*O*). Cuando el represor está inactivo, los genes se expresan. El represor puede ser inactivado por un inductor o por mutación. (b) En el control positivo, se requiere la presencia de un factor activo para que ocurra la expresión génica, como se muestra en el operón *X Y Z* de la figura. Pequeñas moléculas pueden convertir un factor inactivo en activo, como es el caso del AMPc y la proteína CAP. Un factor de control positivo inactivo no da lugar a expresión génica. El activador se une a la región controladora del operón, denominada *I* en este caso. (Las posiciones de *O* e *I* respecto al promotor, *P*, están dibujadas de forma arbitraria en los dos ejemplos.)

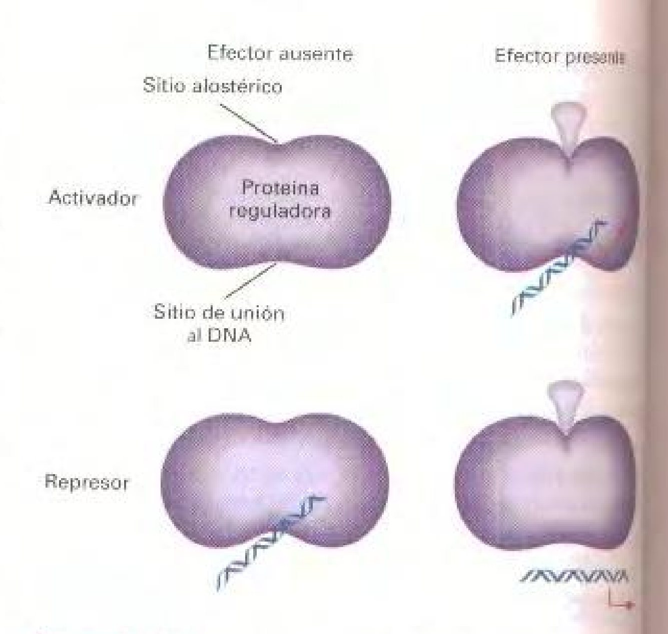


Figura 11-14. Acción de los efectores alostéricos sobre las actividades de unión al DNA de los activadores y represores.

Doble control positivo y negativo: el operón de la arabinosa

El metabolismo del azúcar arabinosa está catalizado por tres enzimas cifradas por los genes *araB*, *araA* y *araD*. La Figura 11-15 muestra un mapa de este operón. La expresión se activa en la **región iniciadora,** *araI*. Cuando el producto del gen *araC* se une a la arabinosa, se activa la transcripción, quizás afectando directamente la unión de la polimerasa de RNA a la región *araI* que contiene el promotor de los genes *araB*, *araA* y *araD* (Fig. 11-16*a*). Esta activación representa un ejemplo de control positivo, porque el producto del gen regulador (*araC*) debe estar activo para que se exprese el operón.

Un control positivo adicional está mediado por el mismo sistema CAP-AMPc que regula la expresión del operón *lac*. En presencia de arabinosa, se requiere tanto CAP-AMPc como la unión del producto del gen *araC* a la región iniciadora para que la polimerasa de RNA se una al promotor de *araB*, *araA* y *araD*. En ausencia de arabinosa, el producto de *araC* asume una conformación diferente y reprime al operón *ara*, uniéndose tanto a *araI* como a una región operadora, *araO*, lo que provoca la formación de un bucle (Fig. 11-16*b*) que impide la transcripción. Por tanto, la proteína AraC adquiere dos conformaciones que llevan a cabo dos funciones opuestas en dos sitios de unión alternativos. La conformación depende de que el inductor, la arabinosa, esté o no unida a la proteína.

Rutas metabólicas

El control coordinado de los genes es un hecho muy generalizado en las bacterias. A principios de los años sesenta, cuando Milislav Demerec estudiaba la distribución de los loci que



Figura 11-15. Mapa de la región *ara*. Los genes *B*, *A* y *D*, junto con los sitios *I* y *O* forman el operón *ara*.

taban a una ruta biosintética común, encontró que los genes de *Salmonella typhimurium* que controlaban algunas etapas de la síntesis del aminoácido triptófano estaban agrupados en una región reducida del cromosoma. Demerec estudió entonces la distribución de genes cuyos productos participaban en varias rutas metabólicas diferentes. Analizando mutaciones auxotróficas que representaban a 87 genes diferentes, encontró que 63 de ellos se localizaban en 17 agrupaciones génicas funcionalmente similares. Una **agrupación génica** se define como dos o más loci que controlan funciones relacionadas y que no están separados por ningún gen no relacionado con ellos.

Además, en aquellos casos en los que se conoce el orden de la actividad catalítica, se observa una notable congruencia entre el orden de los genes en el cromosoma y el orden en que actúan sus productos en la ruta metabólica. Esta congruencia queda reflejada en la organización de la agrupación del triptófano de *E. coli* (Fig. 11-17), caracterizada por Charles Yanofsky.

COROLARIO

Los genes que participan en la misma ruta metabólica están frecuentemente agrupados en los cromosomas procarióticos y, a menudo, en el mismo orden que las reacciones que controlan. Además, los genes de una agrupación se expresan a la vez.

Ejemplos adicionales de control: la atenuación

El operón *lac* es un ejemplo de sistema inducible, en el sentido de que la síntesis de una enzima se induce por la presencia de su sustrato. También existen sistemas reprimibles, en los que un exceso de producto detiene la producción de las enzimas que participan en su síntesis. Se ha identificado un sistema de control de este tipo en una agrupación de genes que controlan la ruta de producción del triptófano. La síntesis del triptófano se interrumpe cuando hay un exceso de triptófano en el medio. Jacob y Monod propusieron que la agrupación de cinco genes *trp* de *E. coli* forma otro operón, que difiere del operón *lac* en que el represor del triptófano sólo se une al operador *trp* cuando *está* unido al triptófano (Fig. 11-17). Recuerde que el represor *lac* se une al operador cuando *no está* unido a la lactosa. Un segundo mecanismo de control modula también la síntesis del triptófano, actuando sobre la actividad enzimática. Es la **retroinhibición**. En este caso, la primera enzima de la ruta, determinada por los genes *trpE* y *trpD*, es inhibida por el propio triptófano.

Como ocurre con el operón *lac*, un análisis posterior reveló otro nivel de control superpuesto al mecanismo básico represor-operador. Al estudiar estirpes mutantes (portadoras de una mutación en *trpR*, el locus represor) que continuaban produciendo mRNA *trp* en presencia de triptófano, Yanofsky encontró que la eliminación de triptófano del medio llevaba a un aumento casi de diez veces en la producción de mRNA *trp*, incluso aunque el represor Trp estuviera inactivo y, por tanto, no pudiera ser responsable del incremento por medio de la desrepresión normal del operador debida a los bajos niveles de triptófano. Además, Yanofsky identificó la región responsable de este incremento, aislando un mutante totalmente constitutivo que producía mRNA *trp* a ese nivel diez veces superior al normal, incluso en presencia de triptófano, y demostró que dicha mutación era una deleción entre el operador y el gen *trpE* (véase el mapa de la Figura 11-17).

Yanofsky aisló el mRNA multigénico del operón *trp*. Tras obtener su secuencia de nucleótidos, encontró una secuencia larga, denominada **secuencia líder**, de aproximadamente 160 bases, en el extremo 5′ antes del primer triplete del gen *trpE*. El mutante que siempre producía mRNA *trp* a máximos niveles contenía una deleción que se extendía desde la posición 130 a la 160 (Fig. 11-18). Yanofsky denominó **atenuador** al elemento inactivado por la deleción, porque su presencia lleva, aparente-

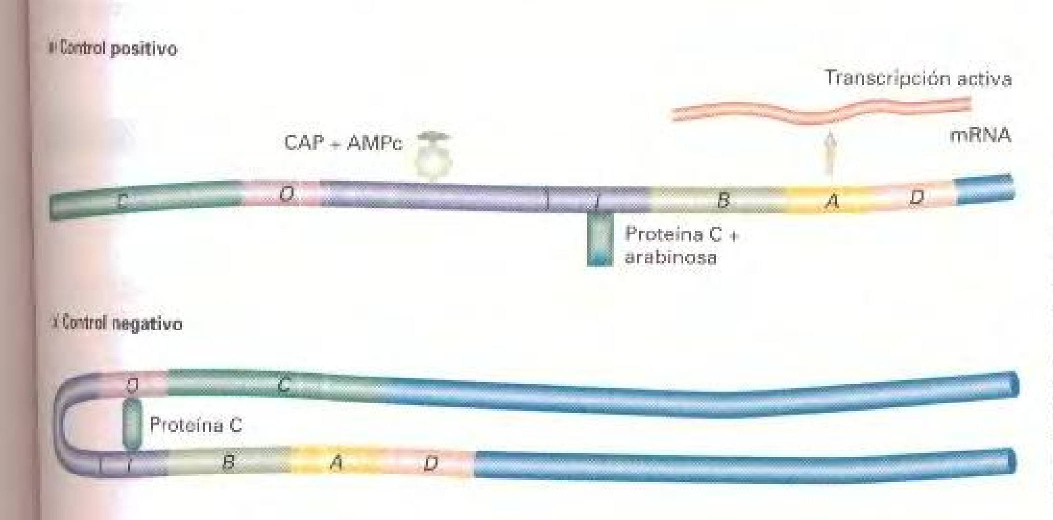


Figura 11-16. Doble control del operón *ara*. (a) En presencia de arabinosa, la proteína AraC se une a la región *araI*, y la proteína CAP, si está unida a AMPc, se une a un sitio adyacente a *araI*. Ello estimula la transcripción de los genes *araB*, *araA* y *araD*. (b) En ausencia de arabinosa, la proteína AraC se une simultáneamente a las regiones *araI* y *araO*, formando un bucle en el DNA. Ello impide la transcripción del operón *ara*.

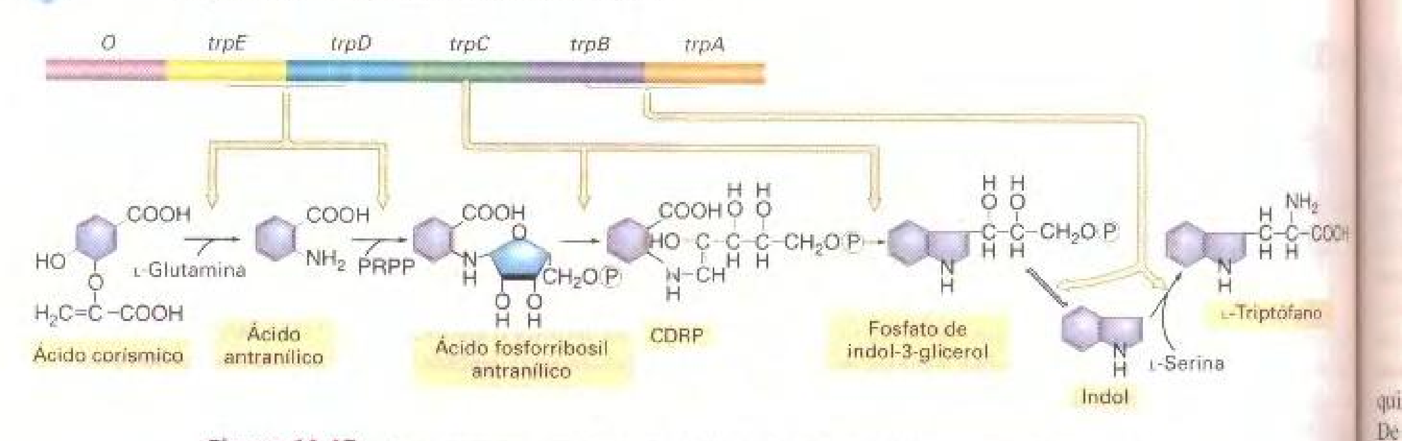


Figura 11-17. Orden en el cromosoma de los genes del operón *trp* de *E. coli* y secuencia de las reacciones catalizadas por los productos enzimáticos de los genes estructurales *trp*. Los productos de los genes *trpD* y *trpE* forman un complejo que cataliza pasos específicos, igual que los productos de los genes *trpB* y *trpA*. La sintetasa del triptófano es una enzima tetramérica formada por los productos de *trpB* y *trpA*, que cataliza un proceso en dos etapas que lleva a la formación del triptófano. (PRPP = pirofosfato de fosforribosilo; CDRP = 1-(*o*-carboxifenilamino)-1-desoxirribulosa 5-fosfato.) (Tomado de S. Tanemura y R. H. Bauerle, *Genetics* 95, 1980, 545.)

mente, a una reducción de la tasa de transcripción cuando está presente el triptófano. La Figura 11-19 muestra la posición de estos elementos en el operón *trp*. Pero, ¿cuál es la función de las posiciones 1 a la 130 de la secuencia líder? Una observación sorprendente aportó la clave para resolver este problema.

Cuando estudiaba los mRNA transcritos por el operón *trp* (utilizando mutantes *trpR*⁻), Yanofsky descubrió que, incluso en presencia de altos niveles de triptófano (que deberían hacer que la región atenuadora redujera en diez veces el nivel de la transcripción), las primeras 141 bases de la secuencia líder se transcribían siempre al máximo nivel, aunque como era de esperar, el mRNA de longitud total sólo aparecía a un nivel diez veces menor. Dicho de otro modo, incluso en presencia de altas concentraciones de triptófano, las primeras 141 bases se transcriben al máximo nivel pero, por algún mecanismo de atenuación que ocurre en esa región, sólo uno de cada diez mRNA se transcribe hasta el final. Ello sugiere que el extremo del atenuador actúa como un terminador de la cadena de mRNA que, en *presencia de triptófano*, interrumpe la transcripción de nueve de cada diez moléculas de RNA. En ausencia de triptófano, el atenuador se desactiva de algún modo, y todas las moléculas de mRNA se completan (de ahí el aumento de diez veces). En aquellos mutantes *trpR*⁻ en los que, además, el atenuador está delecionado, y se produce el bloqueo en la extensión del mRNA, de modo que la transcripción continúa en cualquier caso (es decir, se produce mRNA al máximo nivel), independientemente de si el triptófano está presente o no.

¿Cómo se produce la interferencia con la terminación en el atenuador en ausencia de triptófano? La Figura 11-20 presenta un modelo basado en estructuras secundarias formadas por el mRNA en la región líder. El modelo propone que una de las dos conformaciones favorece la terminación de la transcripción y que la otra favorece la elongación. La traducción de parte de la secuencia líder induciría la conformación que favorece la terminación.

Se sabe que, de hecho, una porción de la secuencia líder cercana al comienzo se traduce y produce un péptido corto de 14 aminoácidos. En dicho segmento traducible hay dos codones para el triptófano (Fig. 11-21). Cuando hay un exceso de triptófano, hay un aporte suficiente de tRNA-Trp para conseguir una traducción eficaz del segmento traducible de la secuencia líder. El mRNA pasa a través del ribosoma a suficiente velocidad como para que el segmento 2 de la secuencia líder se introduzca en el ribosoma antes de que pueda formar una estructura en hor-

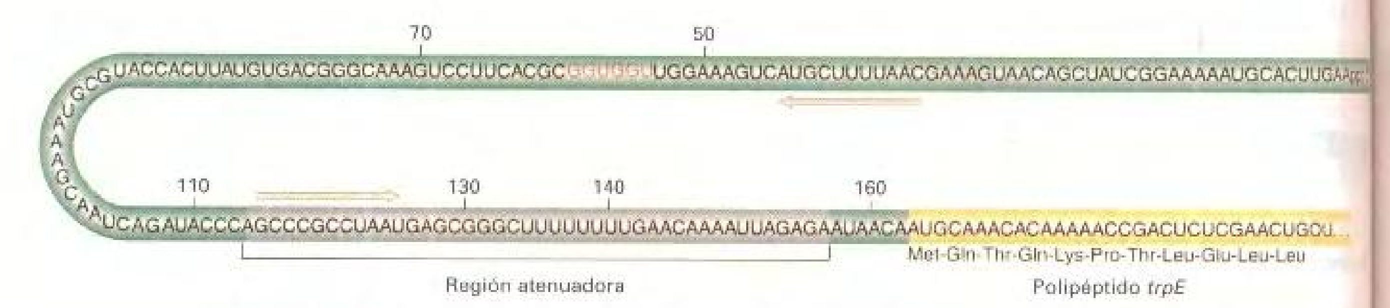


Figura 11-18. Secuencia líder, con el segmento atenuador del operón *trp* y el principio de la secuencia estructural *trpE* (se indica la secuencia de aminoácidos del polipéptido *trpE*). (Modificado de G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.ª ed. Copyright © 1978 por W. H. Freeman and Company. Basado en datos no publicados de Charles Yanofsky.)



Figura 11-19. Representación del operón *trp* en la que se muestran los diferentes sitios controladores del promotor (*P*), el operador (*O*) y el atenuador (*A*), así como la secuencia líder (*L*) y los genes de las enzimas de la ruta de síntesis del triptófano (*E, D, C, B* y *A*). (Adaptado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 por Lubert Stryer.)

quilla con el segmento 3, como se muestra en la Figura 11-20*b*. De este modo, el segmento 3 puede formar una estructura terminadora de la transcripción con el segmento 4. Sin embargo, cuando hay poco triptófano, la traducción se hace más lenta en el segmento 1 en los codones Trp, por la escasa disponibilidad relativa de tRNA-Trp. Como muestra la Figura 11-20*c*, esta situación permite la formación de una estructura en horquilla entre los segmentos 2 y 3, impidiéndose la formación de la estructura terminadora entre los segmentos 3 y 4. Como consecuencia, en condiciones en las que hay poco triptófano, la transcripción no se detiene en el atenuador. De esta forma, se consigue un nivel diez veces superior de enzimas biosintéticas del triptófano de la que se consigue por la interacción represor-operador. El análisis de numerosas mutaciones puntuales en la secuencia líder *trp* que favorecen o desfavorecen las respectivas estructuras secundarias ofrece un apoyo contundente al modelo de atenuación de Yanofsky.

Varios operones de enzimas implicadas en rutas biosintéticas tienen controles de atenuación similares al descrito para el operón del triptófano. Por ejemplo, la región líder del operón *his*,

(b) Niveles altos de triptófano

(c) Niveles bajos de triptófano

Figura 11-20. Modelo para explicar la atenuación del operón *trp*. (a) Estructuras secundarias propuestas para la región líder *trp* que causa la terminación en *E. coli*. Cuatro regiones pueden establecer emparejamientos de bases para formar estructuras en horquilla. (b) Cuando el triptófano es abundante, el segmento 1 del mRNA *trp* se traduce por completo. El segmento 2 se introduce en el ribosoma (aunque no es traducido), lo cual permite el emparejamiento de los segmentos 3 y 4. Esta región emparejada sirve, de algún modo, como señal para que la polimerasa de RNA detenga la transcripción. Por el contrario, cuando el triptófano es escaso (c), el ribosoma se detiene en los codones del segmento 1. El segmento 2 interacciona con el 3 en lugar de introducirse en el ribosoma, de modo que los segmentos 3 y 4 no puedan emparejar. Como consecuencia, la transcripción continúa. (De D. L. Oxender, G. Zurawski y C. Yanofsky, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 1979, 5524.)

Met - Lys - Ala - Ile - Phe - Val - Leu - Lys - Gly - Trp - Trp - Arg - Thr - Ser - Stop

5' AUG AAA GCA AUU UUC GUA CUG AAA GGU UGG UGG CGC ACU UCC UGA 3'

50

Figura 11-21. Se muestra el segmento traducido de la región *trp* líder, junto a la secuencia correspondiente del mRNA líder. La traducción de la secuencia líder termina en el codón de fin de mensaje (stop).

que determina las enzimas de la ruta biosintética de la histidina, contiene una región traducible con siete codones para histidina consecutivos. Mutaciones en otros loci que dan lugar a un descenso en los niveles de tRNA para histidina producen niveles parcialmente constitutivos de las enzimas determinadas en el operón *his*.

COROLARIO

El operón *trp* está regulado por un sistema de control negativo represor-operador que reprime la síntesis de enzimas del triptófano cuando ese aminoácido está presente en el medio. En un segundo nivel de control participa una región atenuadora donde se induce la terminación de la transcripción en presencia de triptófano.

El fago λ: un complejo de operones

Además de proponer el modelo del operón, Jacob y Monod sugirieron que la actividad genética de los fagos atemperados podía estar controlada por un sistema análogo al del operón *lac*. En el estado lisogénico, el genoma del profago está inactivo (reprimido). En la fase lítica, se activan (inducen) los genes necesarios para la reproducción del fago. La propuesta de Jacob y Monod de que en los fagos existía un control similar al del operón tuvo como consecuencia que el sistema genético del fago λ se haya convertido en uno de los sistemas de control mejor conocidos. En este fago, efectivamente, los dos estados funcionales están controlados por un sistema tipo operón. El sistema, sin embargo, ha resultado ser más complicado de lo que se supuso inicialmente.

Allan Campbell obtuvo y cartografió muchas mutaciones letales condicionales en el fago λ (Fig. 11-22), aportando pruebas evidentes de que los genes con funciones relacionadas estaban agrupados. Además, comprobó que las mutaciones que afectaban a los genes *N*, *O* y *P* impedían la expresión de la mayor parte del genoma tras la infección del fago. Sólo los loci situados entre *N* y *O* seguían activos. Pronto veremos el significado de esta observación.

Cuando las bacterias normales se infectan con partículas de fagos λ silvestres, pueden ocurrir dos cosas: (1) el fago puede integrarse en el cromosoma bacteriano como un profago inerte (lisogenizando así a la bacteria), o (2) el fago puede producir las proteínas necesarias para que se produzca la maduración del fago y la lisis celular. Cuando se inoculan partículas de fagos silvestres sobre un césped de bacterias sensibles, aparecen halos de lisis en aquellos lugares donde las bacterias han sido infectadas y lisadas, pero estos halos son turbios debido a la presencia de bacterias lisogenizadas (que son resistentes a nuevas infecciones) en dichos halos.

Pueden buscarse fagos incapaces de lisogenizar a las células seleccionando fagos mutantes que formen halos claros. Estos mutantes *claros* (*c*) son análogos a los mutantes *I* y *O* de *E. coli*. Por ejemplo, los mutantes condicionales en un sitio llamado *cI* son incapaces de lisogenizar en condiciones restrictivas, lo que sugiere que la mutación provoca un defecto en un represor o en un sitio de unión del represor (operador). Sin embargo, estos mutantes tampoco son capaces de inducir la lisis tras infectar una célula previamente lisogenizada con un profago silvestre, lo cual indica que el operador es funcional, porque el represor del fago silvestre es claramente capaz de impedir que el fago mutante entre en la fase lítica. Aparentemente, la mutación *cI* produce un represor defectuoso en el sistema de control del fago.

Se han aislado también mutantes virulentos del fago λ, que no lisogenizan las células, sino que entran en el ciclo lítico y se reproducen tras infectar a una célula lisogenizada. Por tanto, estos fagos mutantes son insensibles al represor de λ. Estudios de cartografía genética han demostrado la existencia de *dos* operadores, designados O_L y O_R, situados a la izquierda y a la derecha de *cI*, respectivamente. Cuando el fago λ infecta a un hospedador no inmune, la polimerasa de RNA comienza la transcripción a partir de dos promotores, P_L y P_R. Esto crea una pugna que determinará si el fago expresa sus funciones virulentas y entra en

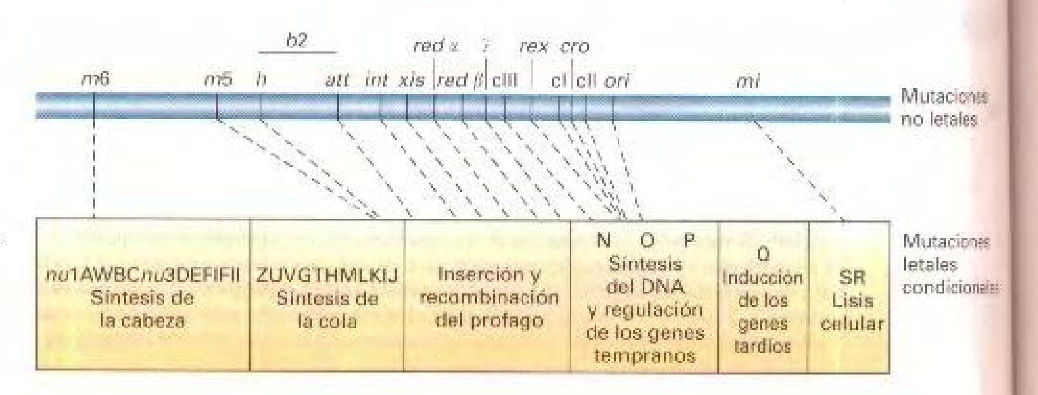


Figura 11-22. Mapa genético del fago λ. Se indican las posiciones de las mutaciones no letales y letales condicionales y las agrupaciones típicas de los genes con funciones relacionadas. (De A. Campbell, *The Episomes*, Harper & Row, 1969.)

el ciclo lítico, o si reprime estas funciones y establece lisogenia. La Figura 11-23 ofrece parte del mapa de λ y muestra la longitud de los distintos transcritos. P_L controla la transcripción hacia la izquierda que da lugar a la proteína antiterminadora N, además de varias funciones líticas. P_R controla la transcripción hacia la derecha, que cubre los genes *cro*, *cII* y *Q*, entre otros. Normalmente, estos transcritos terminan en puntos críticos específicos, antes de que puedan transcribirse los genes clave necesarios para el desarrollo lítico. Sin embargo, si se sintetiza la proteína N, ésta impide la terminación del transcrito (véase la Fig. 11-23) y se expresan las funciones líticas. La transcripción a partir de P_L y P_R puede ser bloqueada por la unión del represor a los operadores O_L y O_R. En el primer caso, se impide la síntesis de la proteína N y, por tanto, también se bloquea la elongación de los transcritos formados a partir de P_L y P_R.

El punto crítico para el establecimiento de la lisogenia es la síntesis del represor de λ, determinado por el gen *cI*, que tiene dos promotores. Uno de ellos, denominado P_E, sirve para establecer la lisogenia. El otro, P_M, sirve para mantenerla. Se requieren proteínas activadoras para que se inicie la transcripción en cada promotor. El activador de P_M es el propio represor determinado por el gen *cI*. Por tanto, para que se sintetice represor en una célula que no contenga moléculas de represor preexistentes, debe utilizarse el promotor P_E, que se activa por el producto del gen *cII*. Por tanto, *cII* debe transcribirse para que se establezca la lisogenia. También se requiere una proteína adicional, la *integrasa*, cifrada en el gen *int*. Éste se transcribe a partir de su propio promotor, P_I (Fig. 11-23), que también debe ser activado por el producto del gen *cII*.

En el estado lisogénico, el represor de λ controla su propia síntesis a partir del promotor P_M, interaccionando con los tres operadores O_R1, O_R2 y O_R3 (Fig. 11-24). Estos operadores tienen distintas afinidades por el represor de λ, siendo $O_R1 > O_R2 > O_R3$. Cuando hay muy poco represor de λ sólo se ocupa el sitio O_R1, que bloquea la expresión de *cro* (la proteína Cro impide la síntesis del represor de λ uniéndose a O_R3). La unión del represor a O_R1 facilita la unión de una segunda molécula de represor a O_R2. Cuando el represor de λ se une a O_R2, activa la transcripción del gen *cI*. Sin embargo, cuando hay demasiado represor, éste se une al operador por el que tiene menos afinidad, O_R3, y esta unión bloquea la transcripción del gen *cI*.

COROLARIO

La regulación de los estados lítico y lisogénico del fago λ proporciona un modelo de interacciones entre sistemas de control que puede ser útil para interpretar la regulación génica en los eucariotas.

Transcripción: regulación génica en eucariotas. Resumen

Los eucariotas se enfrentan a la misma tarea básica que los procariotas de coordinar la expresión de sus genes, si bien realizan esta coordinación de un modo mucho más complicado. Algunos genes deben responder a cambios en las condiciones fisiológicas, mientras que muchos otros forman parte de circuitos genéticos regulados durante el desarrollo que organizan a las células en tejidos y a éstos en un organismo completo (excepto en los eucariotas unicelulares). En estos casos, las señales que controlan la expresión génica son los productos de genes reguladores del desarrollo, más que señales procedentes del ambiente externo.

La mayoría de los genes eucarióticos están controlados al nivel de transcripción y los mecanismos son, conceptualmente, pa-

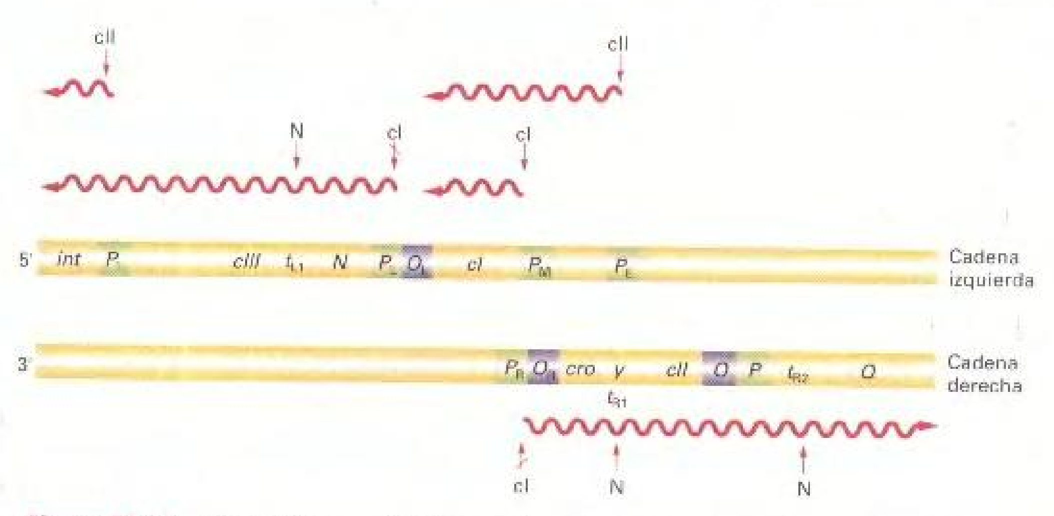


Figura 11-23. Mapa genético parcial del fago λ, con los genes principales y las proteínas reguladoras. Las líneas onduladas representan mRNA, y muestran el inicio, la dirección y la longitud de los transcritos. Una línea vertical al *principio* de un mRNA marca el sitio donde el producto génico indicado activa a un promotor. Si la flecha está atravesada por una barra inclinada, el producto génico reprime la transcripción. Cuando una flecha señala un sitio *dentro* de un mRNA, el producto génico indicado impide la terminación de la transcripción en ese sitio. Como indica el esquema, cuando la proteína N no actúa sobre ellos, t_{L1} es un terminador potencial de P_L y t_{R1} es un terminador potencial de P_R. (De D. Wulff y M. Rosenberg, en *Lambda II*, R. W. Hendrix et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983.)

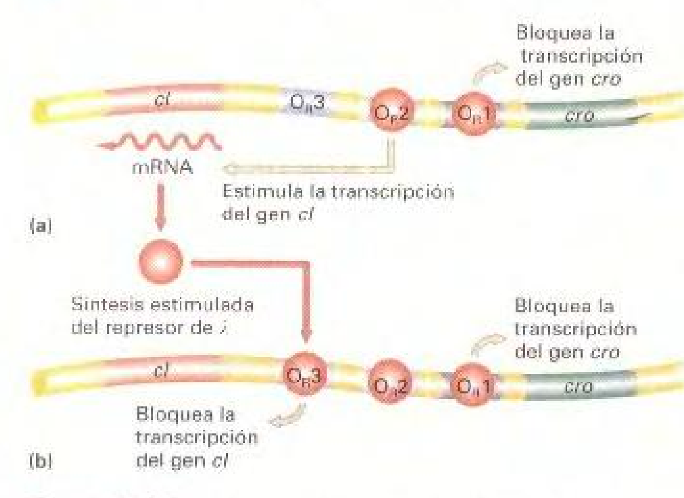


Figura 11-24. Autorregulación de los niveles del represor cI. (a) La unión del represor cI a O_R1 reprime la transcripción de *cro* y potencia la unión de una molécula de cI a O_R2, lo cual, a su vez, estimula la transcripción del represor cI. (b) Cuando los niveles del represor cI son altos, éste se une a un tercer sitio, O_R3. Como O_R3 solapa con el promotor de *cI*, se bloquea la posterior producción de cI, hasta que los niveles bajan, y el sitio O_R3 queda libre otra vez. (De L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 por Lubert Stryer.)

recidos a los de bacterias: proteínas reguladoras en *trans* que operan uniéndose específicamente a secuencias diana del DNA, que actúan como reguladores de acción *cis*. No obstante, se requiere una regulación mucho más compleja para coordinar la actividad génica a lo largo de la vida de un organismo multicelular, por lo que también hay aspectos considerablemente novedosos. En este capítulo y en los siguientes veremos ejemplos de algunas de estas novedades.

El número de genes de los eucariotas es, típicamente, mucho mayor que el de los procariotas, a veces varios órdenes de magnitud mayor. Los genes de los organismos superiores también tienden a ser más grandes, debido a que las secuencias que actúan en *cis* pueden estar situadas a varias decenas de miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción y a que, en ocasiones, se requiere una batería de factores reguladores para conseguir la correcta regulación de ciertos genes.

Control en *cis* de la transcripción

Como vimos en el Capítulo 10, los eucariotas tienen tres tipos diferentes de polimerasas de RNA (nombradas con los números romanos I, II y III). Todas las moléculas de mRNA son sintetizadas por la polimerasa de RNA II, y el resto del capítulo tratará sobre la transcripción de las moléculas de mRNA. Para obtener un máximo nivel de transcripción, la polimerasa de RNA II requiere la cooperación de múltiples elementos reguladores en *cis*. Podemos distinguir tres clases de elementos en función de su posición relativa. Cerca del sitio de inicio de la transcripción están el promotor mínimo (el sitio de unión de la polimerasa de RNA II) y las secuencias proximales que actúan en *cis*. Estas interaccionan físicamente con proteínas que ayudan a la unión de la polimerasa de RNA II a su promotor. Otras secuencias en *cis* actúan a una considerable distancia. Estos elementos se denominan intensificadores y silenciadores. A menudo, un intensificador o un silenciador sólo actúa en uno o unos pocos tipos celulares de un eucariota multicelular. Los promotores, los elementos próximos al promotor y los elementos que actúan a distancia son secuencias diana para la unión de diferentes proteínas de unión a DNA que actúan en *trans*.

El promotor mínimo y los elementos próximos al promotor

La Figura 11-25 muestra un esquema del promotor mínimo y de los elementos próximos al promotor. Llamamos **promotor mínimo** a la región comprendida entre el sitio de inicio de la transcripción y la secuencia TATA, que se encuentra aproximadamente 30 pb aguas arriba. Este promotor mínimo es incapaz por sí mismo de mediar una transcripción eficaz y precisa para de los **elementos proximales**, situados a unos 100-200 pb del sitio de inicio de la transcripción. La secuencia CCAAT funciona como uno de ellos y un segmento rico en GC puede ser otro. La Figura 11-26 ilustra cómo afectan las mutaciones en estos elementos a la tasa de transcripción.

Elementos que actúan en *cis* independientemente de la distancia

En eucariotas se conocen dos clases de elementos que actúan en *cis* y que pueden hacerlo a una distancia considerable del promotor. Los **intensificadores** son secuencias de acción *cis* que aumentan mucho las tasas de transcripción de promotores que se encuentran en la misma molécula. Actúan por tanto activando la transcripción, es decir, regulándola positivamente. Por el contrario, los **silenciadores** son secuencias de acción *cis* a las que se unen represores, inhibiendo a los activadores y reduciendo el nivel de transcripción. Los intensificadores y los silenciadores se parecen a los elementos proximales en cuanto que a ellos se unen proteínas reguladoras que actúan en *trans*. Se diferencian de ellos, sin embargo, en que son capaces de actuar a distancia, algunas veces a 50 kb o más, y en que pueden operar aguas arriba o aguas abajo del promotor al que controlan. Los elementos intensificadores y silenciadores están estructurados de forma compleja. La Figura 11-27 muestra la secuencia de DNA del intensificador de SV40 (del inglés *Simian Virus 40*), que se requiere para conseguir un nivel elevado de expresión de los transcritos del virus. El intensificador contiene cinco elementos necesarios para alcanzar el máximo nivel de transcripción. Se conocen intensificadores compuestos por múltiples copias de un elemento de unión. Estas diferentes secuencias sirven como sitios de reconocimiento para proteínas específicas reguladoras en *trans*.

Mecanismos de acción a distancia

¿Cómo regulan la transcripción los intensificadores y los silenciadores a muchos miles de pares de bases de distancia? La mayor parte de los modelos que explican estas acciones incluyen

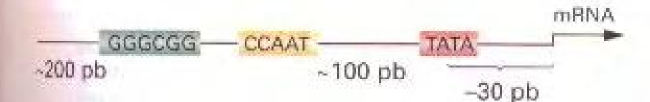


Figura 11-25. Región promotora de los eucariotas superiores. La secuencia TATA se encuentra aproximadamente a 30 pares de bases del sitio de iniciación del mRNA. Normalmente existen dos o más elementos próximos al promotor, situados a 100 y 200 pb aguas arriba del sitio de inicio del mRNA. Se indican la secuencia CCAAT y la secuencia rica en GC. Otros elementos aguas arriba de acción cis son las secuencias GCCACACCC y ATGCAAAT.

algún tipo de bucle en el DNA. La Figura 11-28 detalla un modelo de la activación del complejo de iniciación (véase también la Fig. 11-29). En este modelo, un bucle en el DNA acerca las proteínas reguladoras unidas a elementos intensificadores lejanos a los complejos proteicos asociados con las secuencias de acción *cis* próximas al promotor.

COROLARIO

Los intensificadores y los silenciadores eucarióticos pueden actuar a gran distancia.

Control en *trans* de la transcripción

Actualmente, se han identificado en eucariotas muchas proteínas reguladoras que actúan en *trans*. Como sus contrapartidas en procariotas, estas proteínas operan uniéndose a secuencias diana específicas en el DNA.

Las proteínas reguladoras que se unen al promotor mínimo y a los elementos proximales ayudan a la polimerasa de RNA II a iniciar la transcripción y, junto a ella, forman el complejo de iniciación, como se ilustra en la Figura 11-29*a*. Varios complejos de factores de transcripción diferentes (complejos TFII) interaccionan con la polimerasa de RNA II. Por ejemplo, el complejo TFIID consta de la proteína de unión a la secuencia TATA (TBP) y más de ocho subunidades adicionales (las TAF). Los

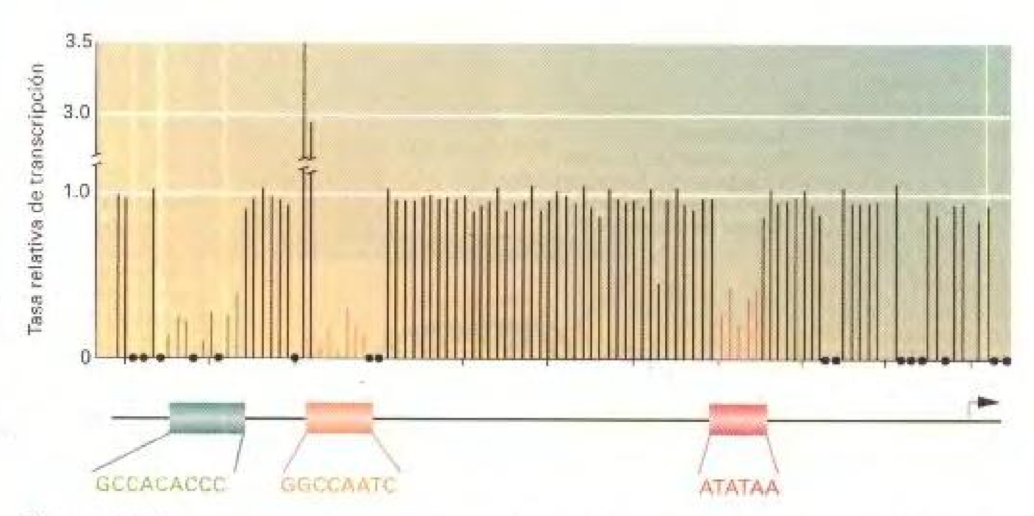


Figura 11-26. Efecto de mutaciones puntuales en el promotor del gen de la globina β. Se analizó el efecto sobre la transcripción de mutaciones puntuales repartidas por toda la región promotora. La altura de las líneas representa la tasa de transcripción, relativa al promotor silvestre, de promotores con un cambio de base en esa posición. El valor 1.0 representa una tasa igual a la del silvestre; las reducciones en la transcripción producen valores menores de 1.0. Se probaron casi todos los nucleótidos de la región promotora, salvo los señalados con puntos negros. El esquema de la parte inferior muestra las posiciones de la secuencia TATA y de dos elementos aguas arriba del promotor. Sólo las sustituciones de bases en esos tres elementos del promotor cambian las tasas de transcripción. (De T. Maniatis, S. Goodbourn y J. A. Fischer, *Science* 236, 1987, 1237.)

1 2
3'TTGGTCGACACCTTACACACAGTCAATCCCACACCTTTCAGGGGTCCGAGGGGTCGT
5'AACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCA

3 4 5
CCGTCTTCATACGTTTCGTACGTAGAGTTAATCAGTCGTTGGTC 5' mRNA temprano
GGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAG 3' mRNA tardío

Figura 11-27. Organización del intensificador de SV40, un virus que infecta a primates. Sus secuencias reguladoras interaccionan con la maquinaria de regulación de la transcripción de la célula eucariótica. Las secuencias sombreadas 1 a 5 indican las secuencias que se requieren para alcanzar los niveles máximos de actividad intensificadora. (De T. Maniatis, S. Goodbourn y J. A. Fischer, *Science* 236, 1987, 1237.)

complejos TFII se conocen como factores de transcripción *basal* o *general*, porque constituyen el requerimiento mínimo para que la polimerasa de RNA II inicie la transcripción (normalmente de forma muy débil) en un promotor. La Figura 11-29*b* muestra la estructura de la proteína de unión a la secuencia TATA unida al DNA. Las secuencias CCAAT y GC son reconocidas por proteínas de unión a DNA adicionales.

También se han identificado algunas de las proteínas que se unen a elementos independientes de la distancia. La proteína cifrada en el gen de levadura *GCN4* es un ejemplo de proteína que se une a un elemento intensificador. Opera sobre intensificadores llamados secuencias activadoras aguas arriba (UAS; del inglés *Upstream Activating Sequences*). GCN4 activa la transcripción de muchos genes de levadura cuyos productos participan en rutas de síntesis de aminoácidos. Cuando faltan aminoácidos, aumenta el nivel de la proteína GCN4 y, como consecuencia, aumentan los niveles de expresión de los genes biosintéticos. Las UAS reconocidas por GCN4 contienen como elemento principal la secuencia de reconocimiento ATGACTCAT.

COROLARIO

El promotor mínimo, los elementos proximales y los elementos independientes de la distancia son sitios del DNA reconocidos por proteínas de unión a DNA específicas de secuencia. Es necesario un conjunto adecuado de estas proteínas de acción *trans* para que la polimerasa de RNA II inicie la transcripción y alcance los niveles máximos de transcripción.

Regulación de la transcripción específica de tejido

Muchos elementos intensificadores de los eucariotas superiores activan la transcripción en tejidos específicos, es decir, inducen la expresión de un gen en uno o unos pocos tipos celulares. Por ejemplo, los genes de los anticuerpos están flanqueados por potentes intensificadores que sólo operan en los linfocitos B del sistema inmunitario. Muchos intensificadores son componentes integrales de complicados circuitos genéticos específicos de tejido, en los cuales se basan los complicados acontecimientos que

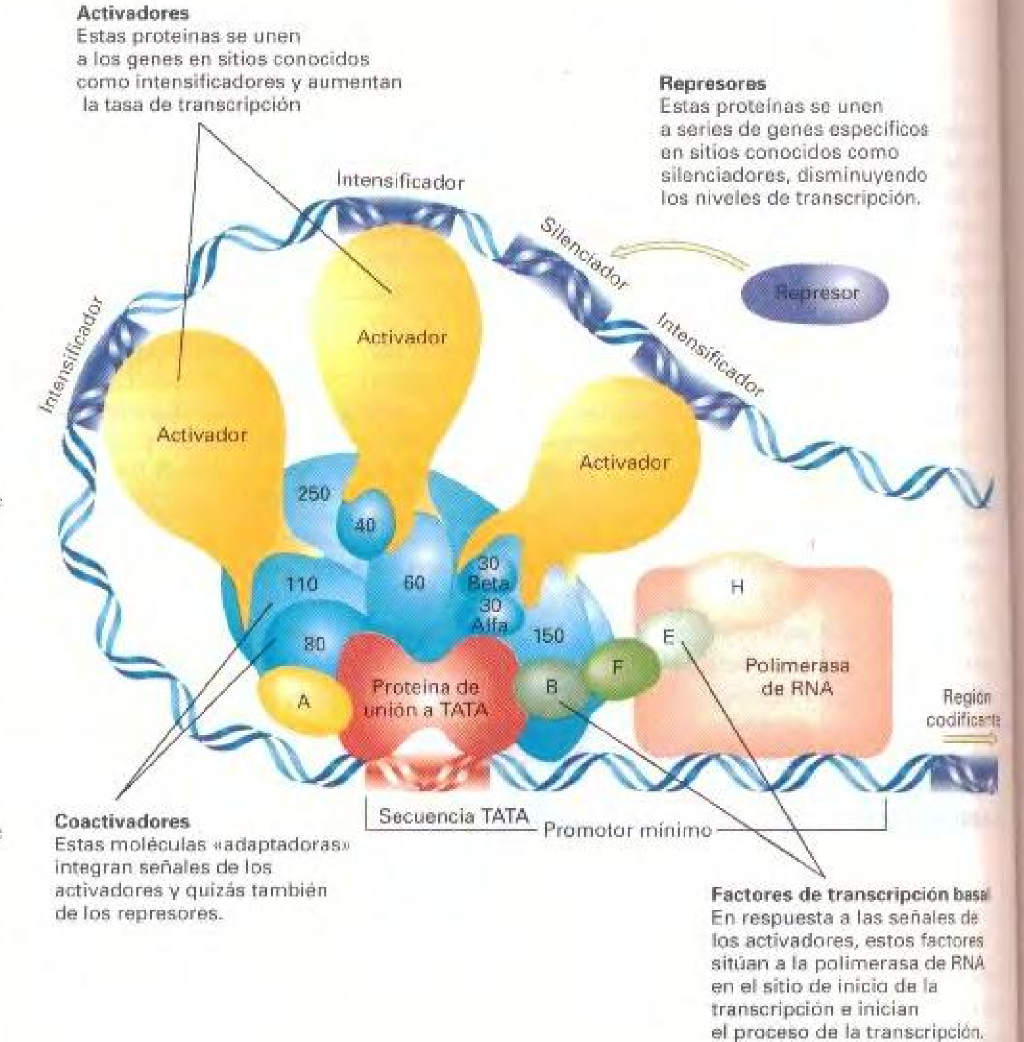
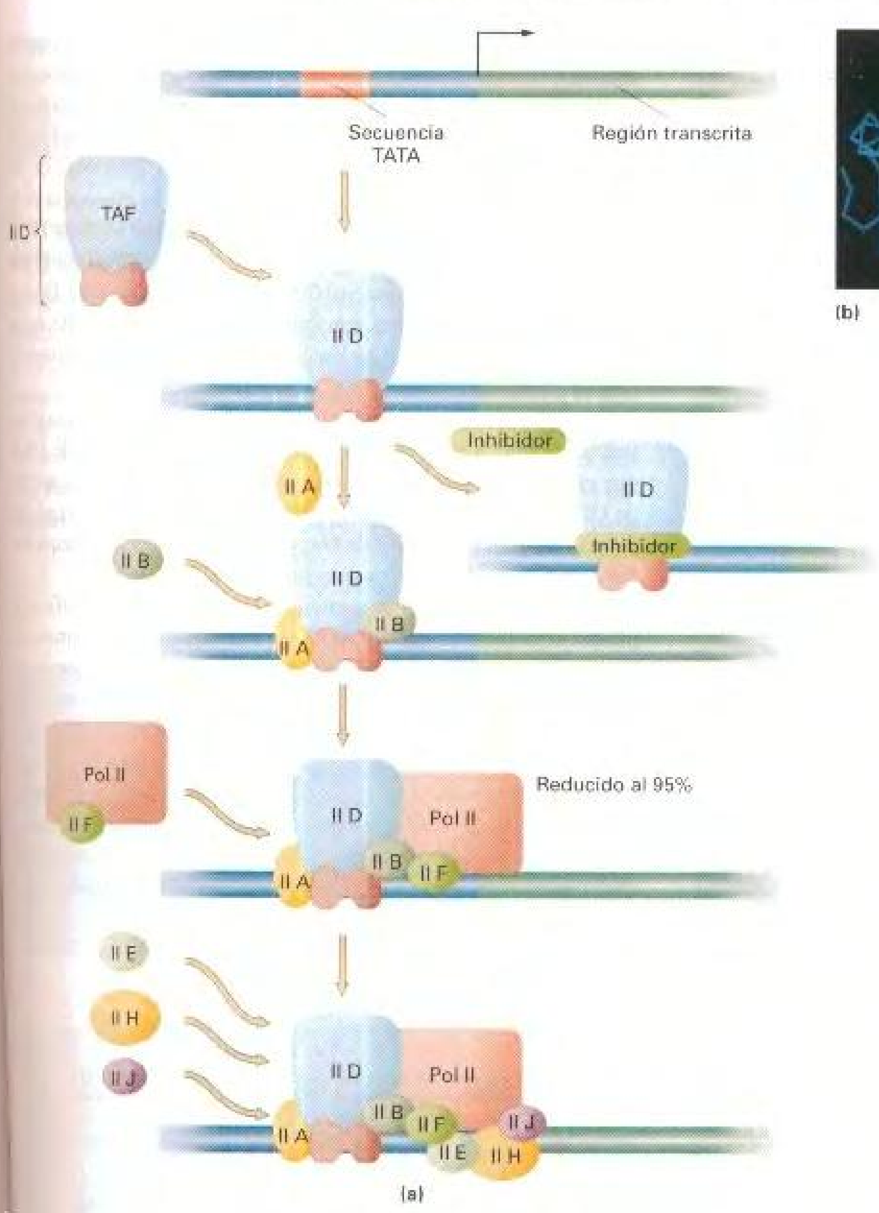


Figura 11-28. El aparato molecular que controla la transcripción en las células humanas consta de cuatro tipos de componentes. Las proteínas numeradas corresponden a los nombres de las subunidades de la polimerasa de RNA II. Cada subunidad se nombra de acuerdo con su masa molecular en kilodaltons. Los factores de transcripción basal (marcados como A, B, F, E, H) son esenciales para que ocurra la transcripción, pero ellos mismos no pueden aumentar o disminuir la tasa de transcripción. Esta tarea la realizan moléculas reguladoras conocidas como activadores y represores. Los activadores, y posiblemente los represores, se comunican con los factores basales por medio de coactivadores, proteínas que están íntimamente asociadas a la proteína de unión a TATA, el primero de los factores basales que interactúa con el promotor mínimo. (De R. Tjian, «Molecular Machines That Control Genes». Copyright © 1995 Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.)



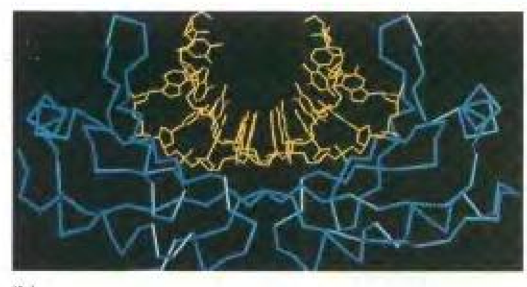


Figura 11-29. (a) La formación del complejo de iniciación de la polimerasa de RNA II comienza con la unión del factor de transcripción TFIID a la secuencia TATA. TFIID está compuesto por una subunidad de unión a la secuencia TATA llamada TBP (marrón) y más de ocho subunidades adicionales (las TAF), representadas por un símbolo grande (azul claro). Los inhibidores pueden unirse al complejo TFIID-promotor, bloqueando la unión de otros factores generales de transcripción. La unión de TFIIA al complejo TFIID-promotor (para formar el complejo D-A) impide la unión de los inhibidores. TFIIB se une entonces al complejo D-A, a lo que sigue la unión de un complejo previamente formado entre TFIIF y la polimerasa de RNA II. Finalmente, TFIIE, TFIIH y TFIIJ se incorporan, en ese orden, al complejo y la transcripción puede iniciarse. (b) La proteína de unión a TATA (azul) es una molécula notablemente simétrica, con forma de silla de montar. Su región inferior se sitúa sobre el DNA y parece curvarlo. Esta curvatura facilita de alguna forma el ensamblaje del complejo que inicia la transcripción. (Parte a de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 por Scientific American Books; la parte b es cortesía de J. L. Kim y S. K. Berley, de *Nature* 365, 1993, 520.)

tienen lugar durante el desarrollo de los eucariotas superiores. La especificidad de tejido se confiere mediante una de dos formas posibles. Un intensificador actúa en un tejido específico si el activador que se une a él está presente sólo en algunos tipos celulares. Alternativamente, un represor específico de tejido puede unirse a un silenciador situado muy cerca del elemento intensificador, dejando a este último inaccesible a su factor transcripcional.

Propiedades de los intensificadores específicos de tejido

En algunos casos, la regulación se controla mediante series sencillas de intensificadores. En *Drosophila*, por ejemplo, las vitelogeninas son grandes proteínas de la yema del huevo que se sintetizan en los ovarios y en el cuerpo graso (que, en esencia, es el hígado de la mosca) de las hembras adultas y que se transportan luego al oocito en desarrollo. Dos intensificadores diferentes situados a unos pocos cientos de pares de bases del promotor regulan el gen de la vitelogenina, uno estimulando su expresión en los ovarios y otro en el cuerpo graso.

El conjunto de intensificadores de un gen puede ser bastante complejo, controlando patrones de expresión génica igualmente complejos. El gen *dpp* (*decapentaplegic*) de *Drosophila*, por ejemplo, determina una proteína que media la señalización intercelular (véase el Cap. 23). Contiene numerosos intensificadores, quizás decenas o cientos, dispersos a lo largo de un segmento de DNA de unas 50 kb. Algunos de ellos están situados 5' (aguas arriba) del sitio de iniciación de la transcripción de *dpp*, otros están situados aguas abajo del promotor, otros en intrones, e incluso algunos están situados aguas abajo del sitio 3' de poliadenilación del gen. Cada uno de estos intensificadores regula la

expresión de *dpp* en una parte distinta del animal en desarrollo. Algunos de los intensificadores mejor caracterizados de *dpp* se muestran en la Figura 11-30.

El requerimiento de múltiples elementos intensificadores para regular la expresión específica de tejido ayuda a explicar el gran tamaño de los genes de los eucariotas superiores. La regulación específica de tejido de un gen puede ser bastante compleja, y precisar la acción de numerosos elementos intensificadores situados a distancia.

Disección de los elementos reguladores eucarióticos

Una parte importante de la Genética moderna tiene que ver con la identificación y caracterización de los elementos reguladores a distancia mediante construcciones transgénicas, en las que moléculas de DNA recombinante se insertan en el genoma de un organismo (véase el Cap. 13). En estas construcciones, se incorporan fragmentos aislados de un gen para determinar qué patrones espaciales y temporales controlan. Mediante este tipo de experimentos podemos localizar elementos reguladores concretos. A su vez, podemos utilizar estos elementos reguladores para desarrollar nuevas formas de identificar genes de interés. Veremos en los siguientes apartados cómo se llevan a cabo tales experimentos, usando como ejemplo los intensificadores transcripcionales. Tenga en cuenta, sin embargo, que las mismas técnicas y la misma lógica se aplican al estudio de otros tipos de elementos reguladores, algunos de los cuales se discutirán en el Capítulo 23.

Utilización de genes testigos para encontrar intensificadores

Normalmente, los intensificadores de un gen ya clonado se identifican usando **genes testigos** (**chivatos** o **delatores**). En este tipo de construcciones, se fusiona un fragmento que contiene el DNA regulador en *cis* (normalmente mediante un sistema de «cortado y pegado» basado en el uso de enzimas de restricción) cerca de una unidad de transcripción que expresa una proteína testigo, es decir, una proteína cuya presencia es fácilmente detectable. Nuestra vieja amiga la enzima β-galactosidasa de *E. coli*, cifrada en el gen *lacZ*, es una proteína testigo utilizada frecuentemente, porque es muy fácil detectar su presencia mediante métodos histoquímicos, añadiendo al medio un sustrato sintético, el X-gal, y observando qué tejidos adquieren coloración azul. La unidad transcripcional con el gen testigo contiene un promotor «débil», que no puede iniciar la transcripción sin la ayuda de un intensificador (Fig. 11-31). La construcción se introduce mediante transformación en la línea germinal del organismo hospedador, y se estudia entonces la presencia de la proteína testigo en las células apropiadas. En las Figuras 11-32 y 11-33 se muestran dos ejemplos de la expresión de genes testigos, uno mediante intensificadores del gen *dpp* de *Drosophila* (Fig. 11-32) y otro mediante un intensificador de músculo que determina expresión en las células precursoras del músculo (Fig. 11-33).

La presencia de la proteína testigo en un tejido indica la existencia de uno o más intensificadores en el fragmento de DNA que estamos estudiando. Una vez determinado que un fragmento de DNA contiene un intensificador, éste puede ser localizado de forma más precisa utilizando fragmentos cada vez más pequeños del DNA clonado en la misma prueba del gen testigo.

En última instancia, la secuencia de DNA del intensificador puede identificarse «recortando» el fragmento que contiene la región reguladora en *cis*. Cuando se conoce esta secuencia, la siguiente pregunta a realizarse es qué proteínas activadoras de la transcripción se unen al intensificador. Actualmente existen métodos que permiten identificar estas proteínas y clonar los genes que las determinan. Una vez clonados los genes correspondientes, éstos pueden analizarse por métodos genéticos y moleculares. Mediante estas aproximaciones experimentales, es posible analizar con detalle los circuitos genéticos que regulan la expresión génica en los eucariotas.

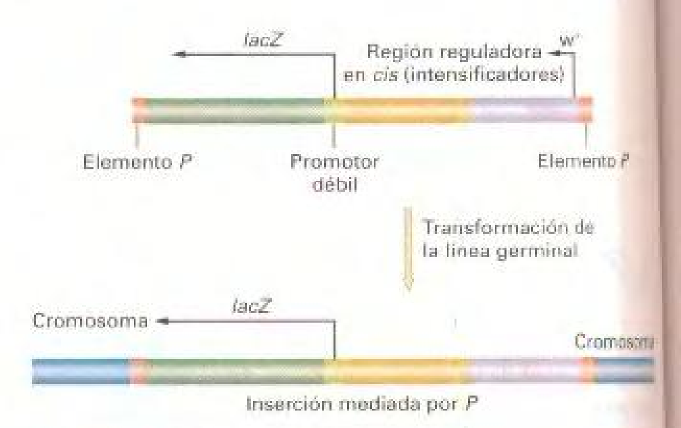


Figura 11-31. Utilización de construcciones con un gen testigo para identificar intensificadores de *Drosophila*. La línea superior representa parte de un plásmido, flanqueada por extremos del elemento *P*, de modo que el material genético situado entre ellos puede insertarse en el genoma por transformación mediada por el elemento *P* (véase el Cap. 20). Una región de DNA de la que se sospecha que contiene uno o más intensificadores se inserta en una posición inmediatamente adyacente a un promotor «débil», es decir, un promotor que no puede iniciar la transcripción por sí mismo. El promotor va unido a su vez al gen estructural *lacZ* de *E. coli* (el gen testigo), que determina la enzima β-galactosidasa. Si en la construcción hay intensificadores, éstos inducirán la expresión específica de tejido del gen *lacZ*. w^+ es el alelo silvestre del gen *white* de *Drosophila* que se utiliza para detectar la presencia en la mosca de la construcción con el gen testigo. Los embriones y los discos imaginales que se muestran en las Figuras 11-32 y 11-33 son ejemplos de expresión de construcciones con genes testigos en *Drosophila* y en ratones.

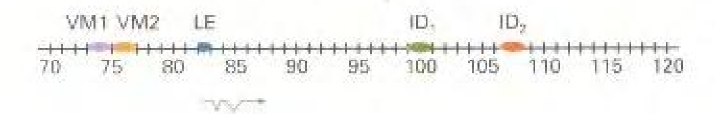


Figura 11-30. Mapa molecular de un gen complejo, el gen *dpp* de *Drosophila*. Las unidades del mapa están en kilobases. La unidad de transcripción básica del gen se muestra debajo de la línea de coordenadas del mapa. Las abreviaturas sobre la línea marcan los sitios de unos pocos de los muchos intensificadores específicos de tejido que regulan la transcripción durante diferentes etapas del desarrollo. Los patrones de expresión específica de tejido que confieren estos intensificadores se muestran en la Figura 11-32, donde también se explican las abreviaturas.

COROLARIO

Las técnicas **basadas en el uso de genes testigos se utilizan para caracterizar los elementos reguladores concretos de los genes.**

Elementos reguladores y mutaciones dominantes

Las propiedades de los elementos reguladores nos ayudan a entender las propiedades de ciertas clases de mutaciones dominantes. Éstas pueden clasificarse en dos tipos generales. En algunas mutaciones dominantes, la inactivación de una de las dos copias de un gen reduce la cantidad de producto génico por debajo de un cierto umbral crítico para la producción de un fenotipo normal. Podemos pensar en estas mutaciones como **mutaciones dominantes por pérdida de función** (a las cuales nos referimos como mutaciones haploinsuficientes en capítulos anteriores). En otros casos, el fenotipo dominante se debe a alguna nueva propiedad del gen mutante, no a una reducción de su actividad normal; esta clase comprende a las **mutaciones dominantes por ganancia de función.**

Muchas mutaciones dominantes por ganancia de función aparecen por la fusión entre sí de fragmentos de dos genes. (Observe, sin embargo, que hay otros mecanismos por el que pueden aparecer mutaciones dominantes por ganancia de función). Este tipo de fusiones pueden aparecer en los puntos de ruptura de reorganizaciones cromosómicas, como inversiones, translocaciones, duplicaciones o deleciones (véase el Cap. 17). Como los intensificadores actúan a gran distancia y pueden activar muchos promotores diferentes, puede ocurrir la desregulación de un gen si una reordenación cromosómica deja intensificadores de un gen adyacentes a la unidad de transcripción de otro gen. En ca-

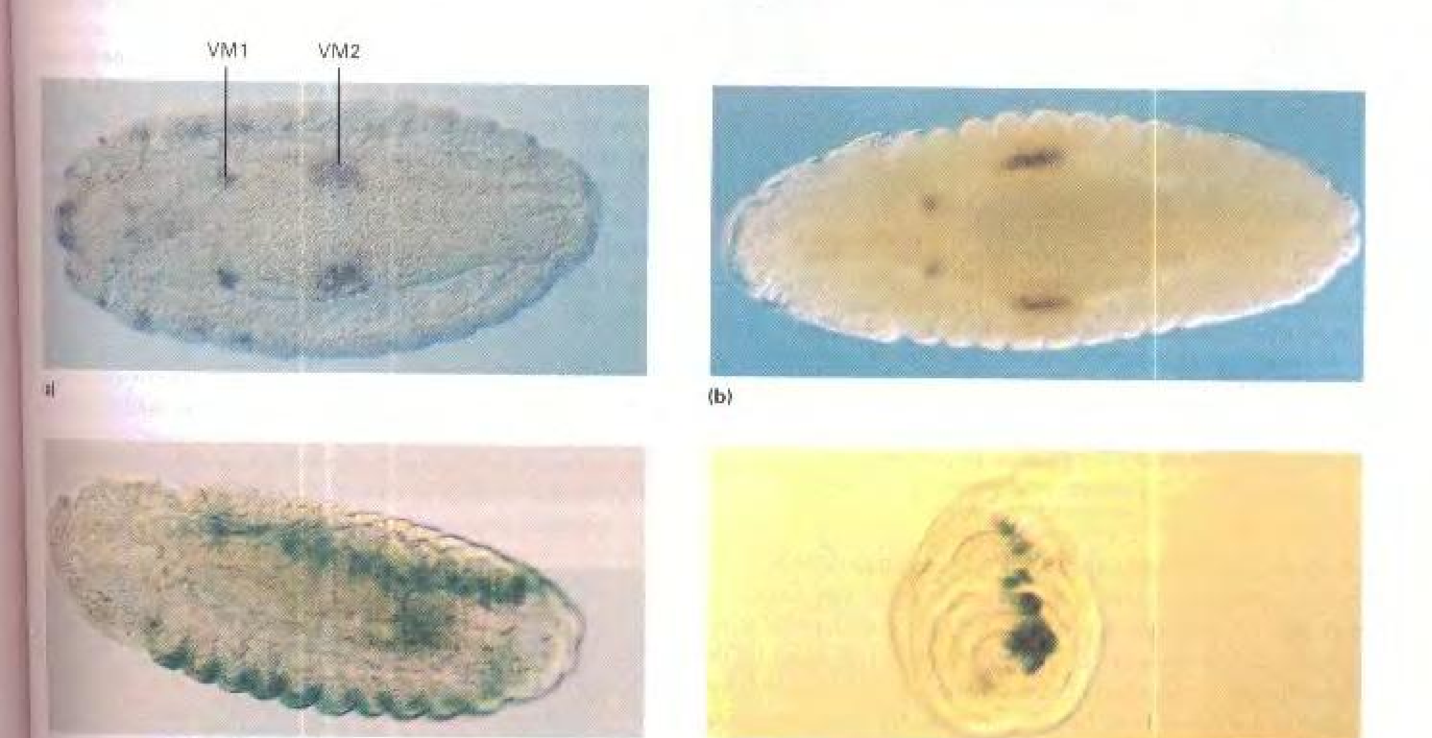


Figura 11-32. Algunos ejemplos de la compleja regulación específica de tejido del gen *dpp*. En las partes a, c y d, la tinción azul se debe a un ensayo histoquímico de la actividad de la enzima β-galactosidasa de *E. coli* (la proteína determinada por el gen testigo *lacZ*). Las posiciones de los intensificadores de *dpp* responsables de los distintos patrones de tinción observados aquí se muestran en la Figura 11-30. (a) Ensayo mediante un gen testigo de la expresión del gen *dpp* de *Drosophila* en dos regiones del mesodermo visceral embrionario, el precursor de la musculatura del intestino. Las dos manchas de la izquierda corresponden al intensificador VM1, que controla la expresión en la parte anterior del mesodermo visceral; las dos manchas de la derecha corresponden al intensificador VM2, que controla la expresión en la parte posterior del mesodermo visceral. (b) Ensayo de hibridación *in situ* de RNA para estudiar la expresión de *dpp* en el mesodermo visceral embrionario. Observe que el patrón de expresión del color azul debido al gen testigo en la parte a es igual al patrón de expresión (marcada en marrón) del mRNA de *dpp* mostrada aquí, lo que confirma la fidelidad del ensayo basado en el gen testigo. (c) Expresión del gen testigo controlada por un intensificador diferente (LE) de *dpp* en el ectodermo lateral de un embrión. (d) Expresión del gen testigo controlada por ID, uno de los muchos intensificadores que determinan la expresión de *dpp* en los discos imaginales (un disco imaginal es un círculo plano de células de la larva que da lugar a uno de los apéndices de la mosca adulta). Se muestra un sector azul que corresponde a la expresión del gen testigo asociado al gen *dpp* en un disco imaginal de pata. (Las partes a y b son cortesía de D. Hursh; la parte c es cortesía de R. W. Padgett; la parte d es cortesía de R. Blackman y M. Sanicola.)

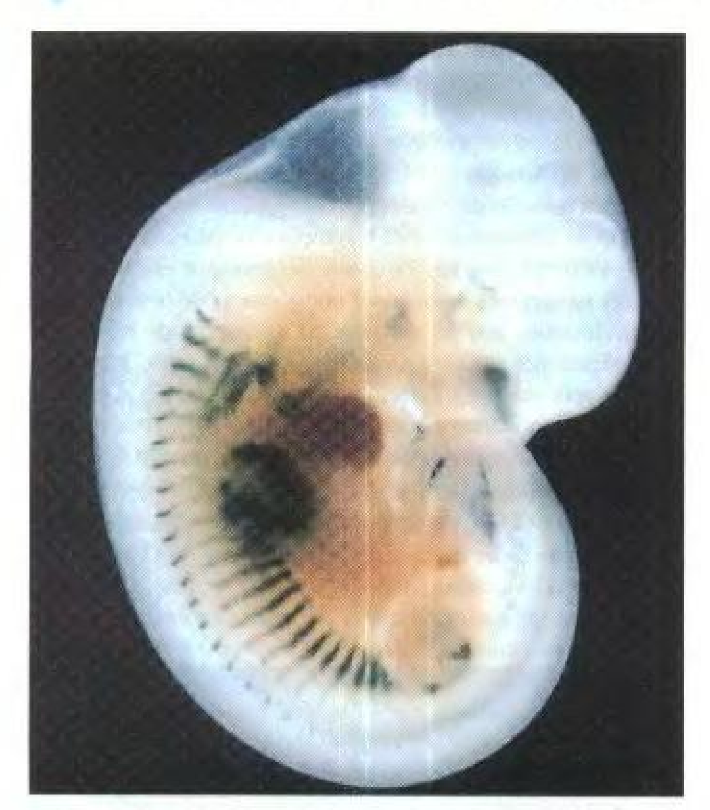


Figura 11-33. Embrión transgénico de 11.5 días que contiene DNA recombinante compuesto por una secuencia de 258 pb fusionada al gen *lacZ* de *E. coli*, que determina la *enzima* β-galactosidasa. El DNA de ratón de 258 pb contiene todas las secuencias reguladoras en *cis* necesarias para dirigir la expresión del gen *lacZ* en células precursoras del músculo, como revela la tinción azul que indica la actividad β-galactosidasa. Los precursores musculares teñidos incluyen los somitos, las yemas de las extremidades y los arcos branquiales del embrión (Reproducido de D. J. Goldhamer, B. P. Brunk, A. Faerman, A. King, M. Shani y C. P. Emerson, Jr., *Development* 121, 1995, 644.)

sos de este tipo, los intensificadores del gen situado a un lado del punto de ruptura regulan la transcripción de un gen situado al otro lado del punto de ruptura. A menudo, esta desregulación lleva a la expresión incorrecta del mRNA cifrado en la unidad de transcripción en cuestión. Tales fusiones ocasionan fenotipos mutantes por ganancia de función, dependiendo de la naturaleza de la proteína cifrada en el mRNA desregulado y de los tejidos en los cuales se expresa incorrectamente.

La clásica mutación dominante *Bar* de *Drosophila* es un ejemplo de desregulación debida a una fusión génica. En la mutación *Bar*, los elementos reguladores en *cis* que promueven expresión en el ojo en desarrollo se fusionan a un gen que normalmente no se expresa en el ojo. Este último gen determina un factor de transcripción cuya expresión incorrecta en el ojo lleva a la muerte de muchas células, lo que provoca el ojo pequeño típico del fenotipo Bar.

En unos cuantos casos, se conoce bien cuál es la causa de la desregulación en este tipo de fusiones génicas. Un ejemplo es la mutación *Tab* (*Transabdominal*) de *Drosophila*, que provoca que una parte del tórax de la mosca adulta se desarrolle como un tejido característico del sexto segmento abdominal (A6) (Fig. 11-34). Se sabe que la mutación *Tab* está relacionada con una inversión cromosómica. Uno de los puntos de ruptura de la inversión corresponde a una región intensificadora del gen *sr* (*striped*). Los intensificadores del gen *sr* inducen la expresión del gen en ciertas partes del tórax de la mosca. El otro punto de ruptura está cerca de la unidad de transcripción del gen *Abd-B* (*Abdominal-B*). Este gen determina un factor transcripcional que normalmente se expresa sólo en las regiones posteriores del animal y que es responsable del fenotipo abdominal de cualquier tejido en el cual se exprese. (Trataremos acerca de genes tipo *Abd-B* en el Capítulo 23, en el apartado de los genes homeóticos). En la inversión *Tab*, los elementos intensificadores de *sr* que controlan expresión torácica quedan junto a la unidad de transcripción de *Abd-B*, provocando que este gen se active exactamente en aquellas partes del tórax donde normalmente lo haría *sr* (Fig. 11-35). Dada la función del factor transcripcional *Abd-B*, su activación en las células torácicas cambia el destino de éstas al de abdomen posterior. De esta forma, se entiende la base molecular de una mutación dominante.

Las fusiones génicas son una fuente muy importante de variación genética, ya que generan patrones nuevos de expresión génica. De hecho, podemos imaginar que este tipo de fusiones puede haber jugado un papel muy importante en los cambios de patrones de expresión génica durante la divergencia y la evolución de las especies. Además de afectar al desarrollo (tratado en el Cap. 23), tales mutaciones juegan un papel fundamental en la formación y desarrollo de muchos cánceres (tratados en el Cap. 22).

COROLARIO

La fusión de intensificadores específicos de tejido a genes que normalmente no están bajo su control puede dar lugar a fenotipos mutantes dominantes por ganancia de función.



Figura 11-34. Mutación *Tab*. La mosca de la izquierda es un macho silvestre. La mosca de la derecha es un macho mutante heterocigótico *Tab*/+. En la mosca mutante, parte del tórax (el tejido negro) ha cambiado a tejido que normalmente se encuentra en la parte dorsal de uno de los segmentos abdominales posteriores. El resto del tórax es normal. (De S. Celniker y E. B. Lewis, *Genes and Development* 1, 1987, 111.)

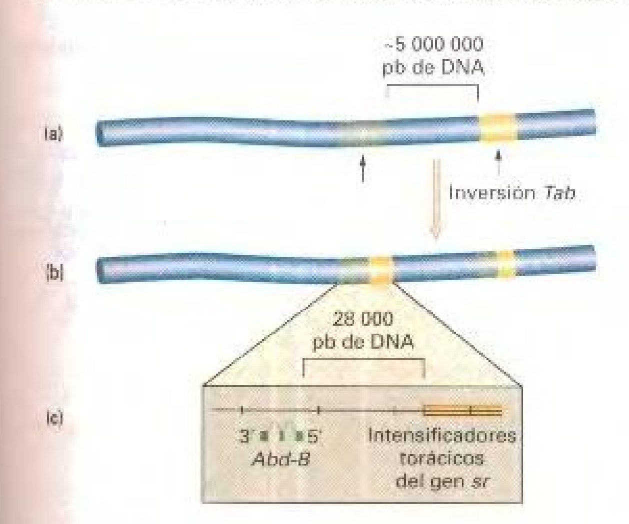


Figura 11-35. La mutación *Tab* se debe a una fusión génica. (a) Se muestran las posiciones de los genes *Abd-B* y *sr* en el mapa de un cromosoma 3 normal. Los dos genes se encuentran, aproximadamente, a 5 millones de pares de bases de distancia, y normalmente hay cientos de genes entre ellos. (b) La inversión *Tab* tiene un punto de ruptura en el gen *Abd-B* y el otro en el gen *sr* (flechas de la parte a). Como resultado, se fusionan fragmentos de los genes *Abd-B* y *sr* en ambos extremos de la inversión. (c) Visión ampliada del punto de ruptura de la inversión más cercano al centrómero. Los puntos de ruptura de la inversión han dado lugar a una molécula de DNA en la cual la región promotora de *Abd-B* está sólo a 28 000 pares de bases de los elementos intensificadores del gen *sr*. Ello provoca que el transcrito *Abd-B* se exprese ectópicamente en algunas partes del tórax de la mosca, donde el gen silvestre *Abd-B* no se transcribe normalmente.

Regulación de los factores transcripcionales

Algunos factores transcripcionales sólo se sintetizan en tejidos concretos. Las actividades de los propios factores transcripcionales están también reguladas en diferentes tipos celulares.

Hormonas esteroides: cómo enlazar la acción de los intensificadores con la fisiología del organismo

De la misma forma que es fundamental en los procariotas ajustar transcripcionalmente la actividad de las proteínas reguladoras con el estado fisiológico de la bacteria, también en los eucariotas es crucial el vínculo entre la regulación transcripcional y la fisiología del organismo. En el Capítulo 23 veremos algunos ejemplos de cómo las rutas de diferenciación y desarrollo de patrones aportan el contexto fisiológico para la activación de factores transcripcionales específicos. Algunas veces, la señal reguladora que activa a los factores transcripcionales eucarióticos proviene de una región muy distante del cuerpo. Por ejemplo, las hormonas liberadas al sistema circulatorio por un órgano que forma parte del sistema endocrino (Fig. 11-36) viajan por la circulación prácticamente a todas las regiones del cuerpo. Así, el sistema endocrino sirve como regulador maestro para coordinar cambios en la transcripción en células de muchos tejidos diferentes. En este mecanismo se basa la determinación del sexo en los mamíferos, que se tratará en el Capítulo 23.

Algunas hormonas son pequeñas moléculas que, debido a sus propiedades de solubilidad en lípidos, atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Este es el caso de las hormonas esteroides, como los glucocorticoides, la testosterona y los estrógenos. Una vez dentro de las células, las hormonas esteroides se unen y regulan a factores transcripcionales específicos. En este sentido, podemos pensar en los esteroides como análogos a los efectores alostéricos que regulan algunos operones bacterianos.

Un ejemplo es la hormona femenina estrógeno. La proteína ovoalbúmina de la clara del huevo se sintetiza en los oviductos de las gallinas como respuesta específica al estrógeno, que provoca un aumento en la transcripción del gen de la ovoalbúmina. Ello se consigue mediante la unión del estrógeno a una proteína receptora que primero reconoce a la molécula de estrógeno en el citoplasma y luego la transporta al núcleo. La molécula receptora es un factor transcripcional que se une entonces al DNA en un sitio intensificador denominado HRE (del inglés *hormone-response element*). La Figura 11-37 ilustra el proceso general de activación por el complejo esteroide-receptor.

COROLARIO

Como las procarióticas, las proteínas eucarióticas reguladoras de la transcripción deben poseer dominios que interaccionen con señales moleculares del estado fisiológico de la célula.

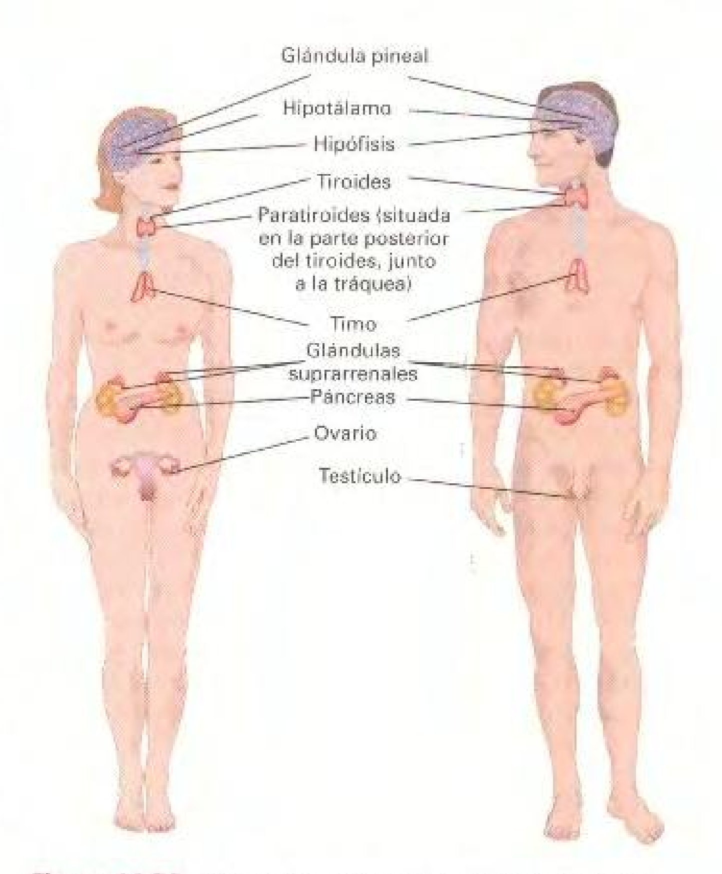


Figura 11-36. Órganos endocrinos humanos. (De W. K. Purves, G. H. Orians y H. C. Heller, *Life: The Science of Biology*. 4.ª ed. Sinauer Associates, Inc. y W. H. Freeman and Company, 1995.)

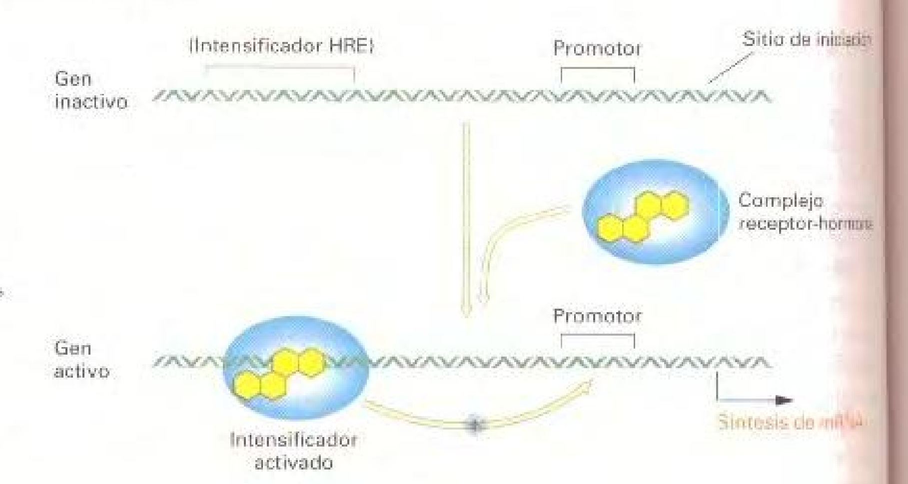


Figura 11-37. Acción de las hormonas esteroides en las secuencias intensificadoras. Una hormona esteroide (azul) se une a una proteína receptora soluble. Este complejo, a su vez, se une a las secuencias intensificadoras y las capacita para estimular la transcripción de los genes de respuesta a hormonas. (De L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 Lubert Stryer.)

Estructura de las proteínas reguladoras

A lo largo de este capítulo, hemos visto que proteínas como el represor Lac, CAP o la proteína de unión a TATA son fundamentales para la regulación génica. Estas proteínas de unión a DNA específicas de secuencia son vitales para la regulación transcripcional de todos los organismos. Debemos, pues, hablar de cómo ocurre la unión a DNA específica de secuencia.

Los análisis de las secuencias de las proteínas y las comparaciones de sus estructuras indican que las proteínas reguladoras que se unen al DNA poseen características comunes. Una de ellas es la existencia de un dominio de unión al DNA, situado en un extremo, que sobresale del «cuerpo» central de la proteína. En algunos casos, el cuerpo central contiene el sitio de unión para el efector alostérico. Esta organización encaja con la del represor Lac (Fig. 11-38) y CAP, así como con la de muchas otras proteínas reguladoras como los receptores de esteroides. En este tipo de proteínas, sobresalen ciertas hélices α que encajan en el surco mayor del DNA. Esta interacción se ha visualizado resolviendo las estructuras tridimensionales de complejos proteína-DNA, como la del complejo operador-represor Lac (Fig. 11-39). En este caso, dos hélices α de la proteína represora interaccionan con dos surcos mayores consecutivos en el DNA del operador. Las hélices están conectadas por un giro en la estructura secundaria de la proteína. Este motivo hélice-giro-hélice (Fig. 11-40) es común a muchas proteínas reguladoras. Hay, sin embargo, muchos otros motivos de unión al DNA. Sólo como ejemplo, la Figura 11-41 muestra la estructura de una parte de una proteína con *dedos de cinc*, en la cual un átomo de cinc se conjuga con cuatro aminoácidos de una pequeña parte de la cadena polipeptídica [dos cisteínas (C) y dos histidinas (H)]. Normalmente, las proteínas con dedos de cinc presentan varios de estos dedos. Parece que cada dedo de cinc interactúa con una secuencia específica del DNA.

COROLARIO

Las estructuras de las proteínas de unión a DNA nos ayudan a entender cómo establecen contacto con secuencias específicas del DNA por medio de dominios polipeptídicos que interaccionan con el surco mayor de la hélice doble del DNA.

Herencia epigenética

El examen general que hemos realizado respecto a la regulación transcripcional da cuenta de la mayor parte de las observaciones que los genetistas han hecho durante todo este siglo. Sin embargo, todavía quedan fenómenos que requieren explicación. Una serie de este tipo de fenómenos, a los que nos referiremos como *herencia epigenética*, parece ser responsable de alteraciones heredables en las que la propia secuencia de DNA no cambia. Es probable que estos fenómenos constituyan otro nivel, poco entendido, de control génico. Algunos ejemplos de herencia epigenética en los cuales el estado de actividad de un gen depende de su historia genealógica son la paramutación y la impronta parental.

Paramutación

El fenómeno de la *paramutación* se ha descrito en varias especies de plantas, siendo especialmente notable el caso del maíz (Fig. 11-42), donde sólo se observa en unos cuantos genes. En

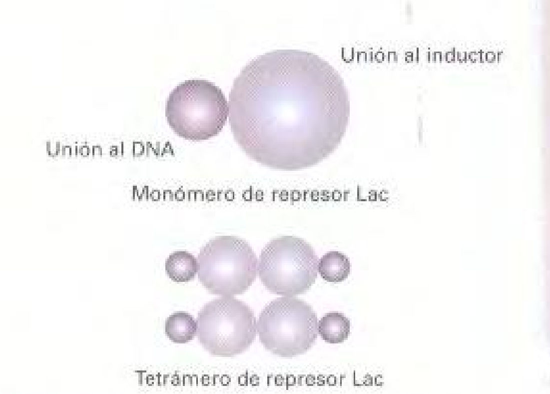


Figura 11-38. Representación esquemática de la organización de los dominios del represor Lac. Todas las mutaciones que afectan a la unión a DNA y al operador alteran el extremo amino terminal de la proteína. Los mutantes afectados en la unión al inductor presentan alteraciones en el resto de la proteína.



Figura 11-39. Imagen del complejo represor Lac-DNA obtenida por estudios de cristalografía de rayos X. En este caso, el tetrámero del represor está unido a dos operadores. Cada dímero se une a un operador. Los operadores mostrados aquí (azul claro y azul oscuro) tienen una longitud de 21 pares de bases. Los monómeros presentan los colores verde, rosa, rojo y amarillo. Observe cómo el fragmento amino terminal de un monómero (rosa) se cruza con otro monómero (verde) para unirse a la primera parte del operador, mientras que el fragmento terminal del segundo monómero (verde) se cruza y se une a la segunda parte del operador. De esta forma, la hélice de reconocimiento de cada una de las dos subunidades se une a regiones consecutivas del mismo operador. (Cortesía de M. Lewis, Geoffrey Chang, N. C. Horton, M. A. Kercher, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan y P. Lu, University of Pennsylvania).

ste fenómeno, algunos alelos especiales, pero aparentemente normales, llamados paramutables, sufren cambios irreversibles tras haber estado presentes en el mismo genoma que otra clase de alelos especiales, llamados paramutagénicos. El gen *B-I* del maíz determina una enzima de la ruta de síntesis de pigmentos tipo antocianina en varios tejidos de la planta. Normalmente, los alelos nulos *b* provocan la ausencia de estos pigmentos, y son completamente recesivos respecto a *B-I*. Hay un alelo paramutagénico especial, llamado *B'*, que confiere capacidad para sintetizar una pequeña cantidad de pigmento antocianina. En el cruzamiento entre homocigotos *B-I* y *B'*, los heterocigotos resultantes están débilmente pigmentados, siendo por tanto indistinguibles de los homocigotos *B'*. Este resultado sugeriría que *B-I* es recesivo frente a *B'*. Si esta sencilla explicación fuera cierta, la autofe-



Figura 11-40. Motivo hélice-giro-hélice de las proteínas de unión a DNA. Cada monómero de estas proteínas diméricas contiene un motivo de este tipo. Las dos unidades están separadas por 34 Å, una vuelta de la hélice de DNA. (De L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 Lubert Stryer.)

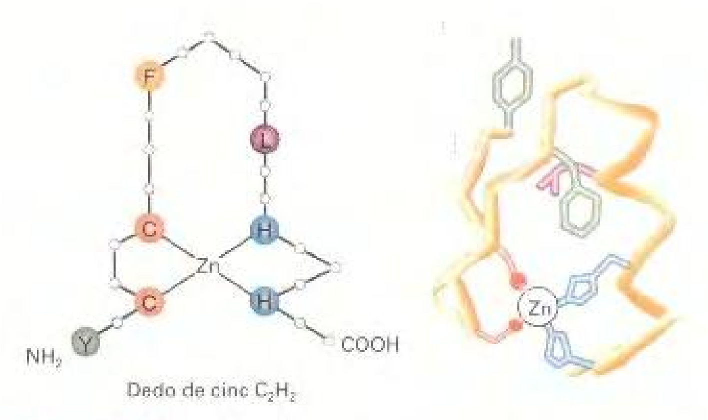


Figura 11-41. Modelo estructural del dominio de unión a DNA conocido como dedo de cinc. (De J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski y Mark Zoller.)

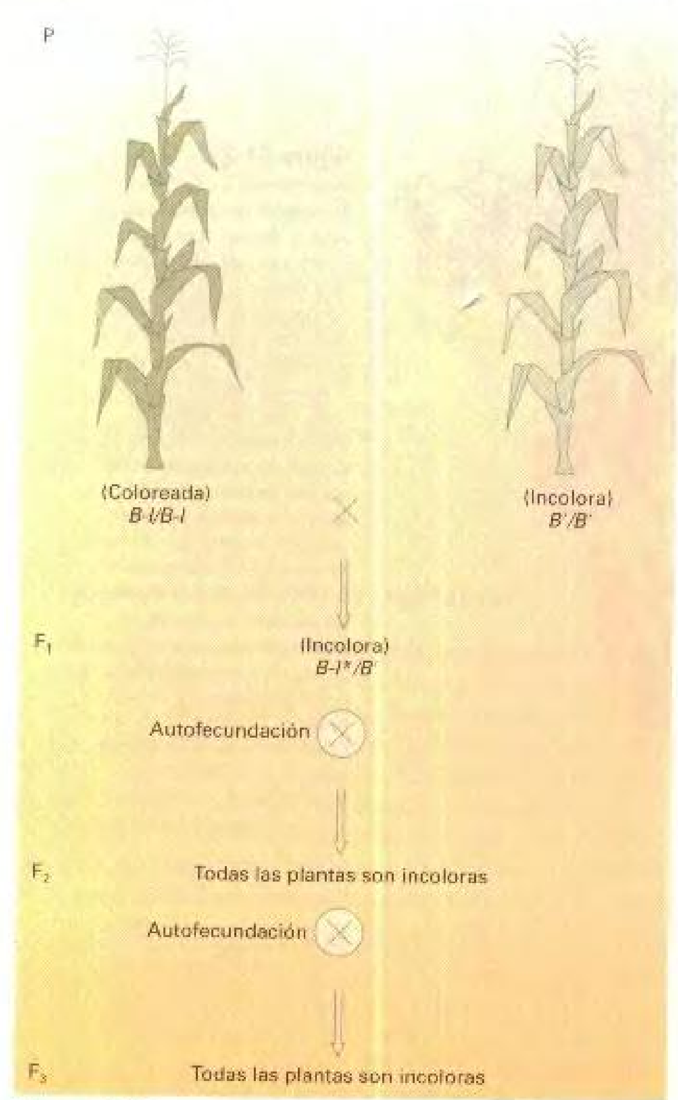


Figura 11-42. Serie de cruzamientos que demuestran la paramutación. La mutación *B-I* da lugar a plantas pigmentadas, mientras que la mutación *B′* da lugar a plantas casi sin pigmento. Normalmente, cuando se cruza *B-I* con plantas recesivas para el alelo *b*, que no produce color, las plantas resultantes son coloreadas. Sin embargo, cuando se cruzan entre sí plantas *B-I* y *B′*, las plantas de la F_1 son prácticamente incoloras, como los homocigotos *B′*. Por tanto, el alelo *B-I* ha sido alterado al estar en el mismo genoma que *B′*, lo que se indica con el símbolo *B-I**. Si esto se debiera simplemente a la dominancia de *B′* sobre *B-I*, la autofecundación de plantas de la F_1 debería generar aproximadamente 1/4 de plantas homocigóticas coloreadas en la F_2. Sin embargo, ninguna planta de la F_2 es coloreada. Los cruzamientos de las plantas de la F_2 y de las subsiguientes generaciones no restauran el fenotipo coloreado. Así, se dice que *B-I* ha sido paramutado por haber estado en el mismo núcleo con el alelo *B′*.

cundación de estas plantas heterocigóticas produciría plantas homocigóticas *B-I*. Sin embargo, en la próxima y en las siguientes generaciones sólo aparecen alelos *B′*, lo que indica que *B-I* ha sido paramutado. De alguna forma, el alelo *B-I* ha variado permanentemente su actividad, al haber estado expuesto (en el mismo genotipo) al alelo paramutagénico *B′* durante una sola generación.

Impronta parental

Otro ejemplo de herencia epigenética, descubierto hace unos 15 años en mamíferos, es la *impronta parental*, en la cual, ciertos genes autosómicos muestran sorprendentes patrones de herencia. Por ejemplo, el gen *Igf2* de ratón se expresa sólo si se hereda del padre. Se dice de él que sufre impronta materna, como si la copia del gen que deriva de la madre fuera inactiva. Al contrario, el gen *H19* de ratón sólo se expresa si proviene de la madre, por lo que se dice de él que sufre impronta paterna. La consecuencia de la impronta parental es que los genes correspondientes se expresan como si fueran hemicigóticos, incluso aunque haya dos copias de estos genes autosómicos en cada célula. Además, cuando estos genes se examinan a nivel molecular, no se observan cambios en sus secuencias de DNA. El único cambio que se aprecia es la presencia de grupos metilo ($—CH_3$) extra en ciertas bases del DNA de los genes sometidos a impronta. Algunas bases del DNA de la mayoría de los organismos superiores están metilados (*Drosophila* es una excepción). Estos grupos metilo se añaden y se eliminan enzimáticamente, mediante la acción de ciertas metilasas y demetilasas. Normalmente, se observa una relación entre el nivel de metilación y la tasa de transcripción de un gen: los genes activos están menos metilados que los inactivos. Se desconoce, sin embargo, si es la alteración en el grado de metilación la que provoca los cambios epigenéticos o si los altos niveles de metilación aparecen como consecuencia de tales cambios.

¿Qué tienen en común estos ejemplos de herencia epigenética? El nexo principal es que, de alguna forma, un fragmento de un cromosoma es marcado como distinto de los demás en base a cuáles han sido sus antepasados o en base a qué otros genes estuvieron en el mismo genoma. En muchos de estos ejemplos, se han asociado diferencias en el nivel de metilación con diferencias en el nivel de expresión génica. No obstante, los mecanismos básicos y las razones por las cuales evolucionaron estos sistemas siguen siendo un misterio.

RESUMEN

El modelo del operón explica cómo se controlan los genes procarióticos mediante un mecanismo que coordina la actividad de varios genes relacionados. En el control negativo, la iniciación de la transcripción está controlada por un represor cuya afinidad de unión al operador puede ser alterada por moléculas inductoras. Para que se active la transcripción es preciso que se inactive el represor, es decir, el elemento de control negativo. En el control positivo, el inicio de la transcripción requiere la activación de un factor. Algunas veces, hay dos sistemas de control superpuestos. Por ejemplo, el sistema represor-operador del operón *lac* está supeditado al sistema de control positivo AMPc-CAP.

Un problema fundamental en el control de la transcripción de los eucariotas es entender cómo se regulan decenas o cientos de miles de promotores para producir los niveles adecuados de mRNA. Se sabe ahora que los promotores están controlados por el número y el tipo de los elementos próximos al promotor

y de los intensificadores, y por la acción de proteínas reguladoras que reconocen dichos elementos. En algunos aspectos, el control transcripcional en los eucariotas es parecido al que se produce en los procariotas, en el sentido de que, en ambos casos, factores que actúan en *trans* reconocen sitios que actúan en *cis*. No obstante, por encima de esta semejanza, hay diferencias derivadas de la naturaleza de las formas de vida unicelulares frente a las multicelulares, como pueden ser las relacionadas con la coordinación de las funciones génicas en tejidos diferentes.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

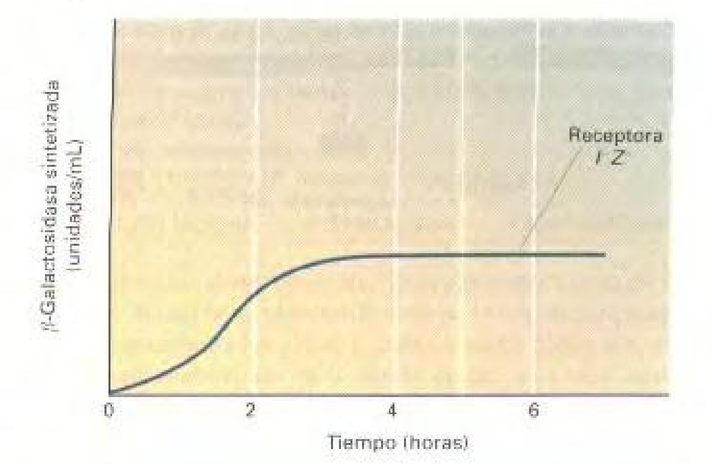
ambiente / promotor / operador / gen / operón / polimerasa de RNA / mRNA / intensificador / factores *trans* / regulación

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

En el Capítulo 7 aprendimos cómo una estirpe Hfr transfiere a una estirpe receptora un segmento del cromosoma, que se rompe entonces y permanece durante un cierto tiempo en el citoplasma de la célula como un fragmento de DNA. Antes de que se dispusiera de plásmidos F', Jacob, Monod y su colaborador Arthur Pardee aprovecharon las propiedades de la transferencia Hfr para crear diploides parciales temporales de la región *lac*, ya que la estirpe Hfr con la que trabajaban donaba la región *lac* de forma temprana durante la transferencia resultante de la conjugación. Durante varias horas, la región *lac* del fragmento cromosómico se convertía en una segunda copia de la región *lac* en la estirpe recipiente. Estos investigadores utilizaron una estirpe Hfr que transfería una región $I^+ Z^-$ a una estirpe receptora que era $I^- Z^-$, y estudiaron la expresión de β-galactosidasa a lo largo del tiempo. La gráfica muestra el resultado de su experimento. Observaron un aumento rápido de la síntesis de β-galactosidasa seguido de represión. ¿Puede ofrecer una explicación a estos resultados?

◆ Solución ◆

Cuando los genes $I^+ Z^+$ se introducen en la célula receptora, no hay represor en su citoplasma, de modo que la síntesis de β-galactosidasa tiene lugar inicialmente al máximo nivel. Sin embargo, el gen I^+ recién introducido determina la síntesis de represor; tras un cierto tiempo, se obtiene suficiente cantidad de represor en el citoplasma de la célula receptora como para bloquear la síntesis de β-galactosidasa, lo cual explica por qué la curva se estabiliza a las dos horas del comienzo del experimento.



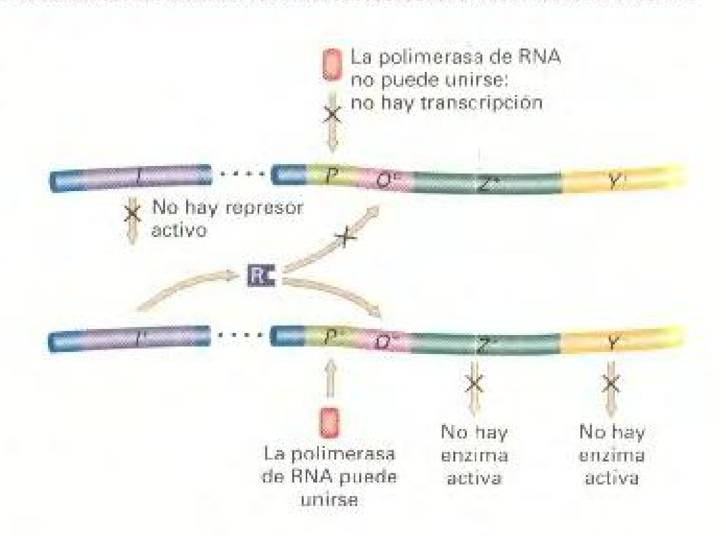
PROBLEMAS RESUELTOS

Esta serie de cuatro problemas resueltos, similares al problema 4 del final del capítulo, está diseñada para probar su comprensión del modelo del operón. Se le presentan varios diploides y se le pide que determine si los productos génicos *Z* e *Y* se forman en presencia y ausencia del inductor. Utilice una tabla similar a la del problema 4 como base para sus respuestas, pero los títulos de las columnas serán (en orden): gen *Z*-inductor ausente; gen *Z*-inductor presente; gen *Y*-inductor ausente; gen *Y*-inductor presente.

1. $\dfrac{I^-P^-O^cZ^+Y^+}{I^+P^+O^+Z^-Y^-}$

◆ Solución ◆

Una aproximación a estos problemas es considerar primero cada cromosoma por separado y dibujar entonces un esquema. La siguiente ilustración muestra un esquema del diploide:

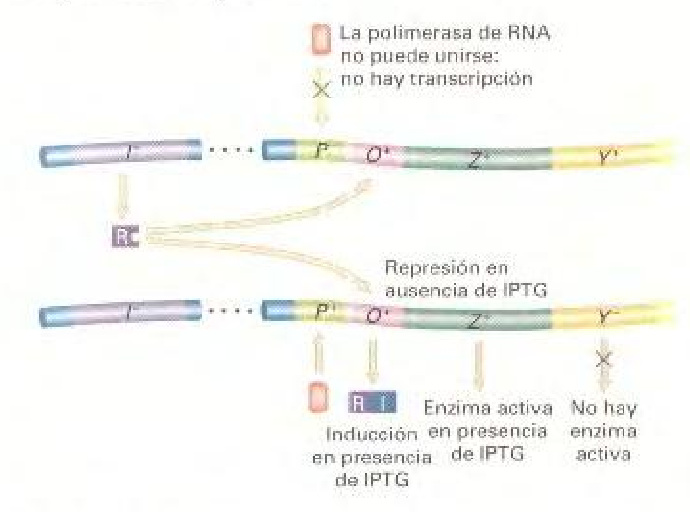


El primer cromosoma es P^-, de modo que no puede sintetizarse ninguna enzima Lac a partir de él. El segundo cromosoma (O^+) puede transcribirse, y esta transcripción es reprimible. Sin embargo, los genes estructurales ligados al promotor funcional son defectuosos. No puede, por tanto, formarse producto Z ni producto Y. Los símbolos que debe añadir a su tabla son «–, –, –, –.»

2. $\dfrac{I^+P^-O^+Z^+Y^+}{I^-P^+O^+Z^+Y^-}$

♦ Solución ♦

El primer cromosoma es P^-, por lo que no puede sintetizarse ninguna enzima a partir de él:

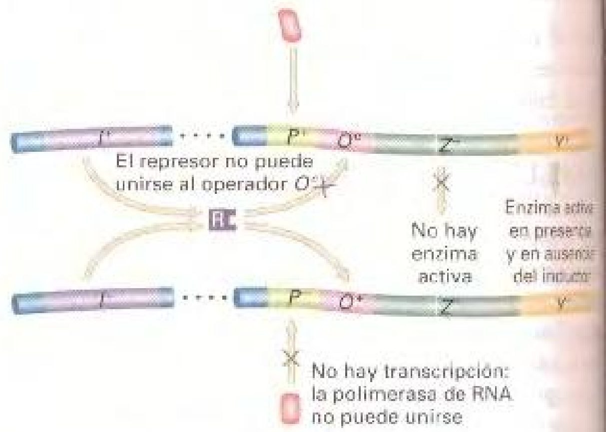


El segundo cromosoma es O^+, de modo que la transcripción estará reprimida por el represor sintetizado en el primer cromosoma, que puede actuar en *trans* a través del citoplasma. Sin embargo, sólo está intacto el gen Z de ese cromosoma. Así, en ausencia del inductor, no se formará ninguna enzima; en presencia del inductor, sólo se formará el producto del gen Z, la enzima β-galactosidasa. Los símbolos que debe añadir a su tabla son: «–, +, –, –».

3. $\dfrac{I^+P^+O^cZ^-Y^+}{I^+P^-O^+Z^+Y^-}$

♦ Solución ♦

Como el segundo cromosoma es P^-, sólo necesitamos considerar el primer cromosoma.

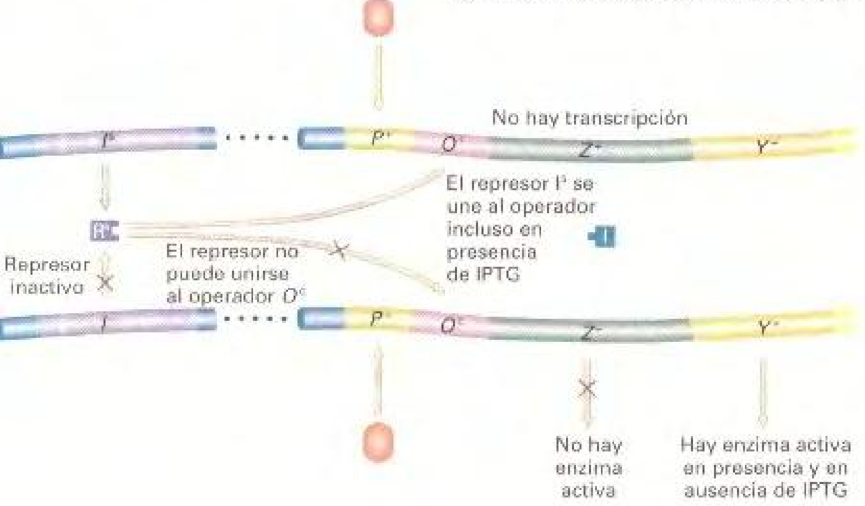


Este cromosoma es O^c y, por tanto, la enzima se sintetiza [illegible] presencia y en ausencia de inductor, aunque sólo es activo el [illegible] Y. Los datos de su tabla serán: «–, –, +, +».

4. $\dfrac{I^SP^+O^+Z^+Y^-}{I^-P^+O^cZ^-Y^+}$

♦ Solución ♦

En presencia de un represor I^S, todos los operadores silvestres estarán inactivados, tanto en ausencia como en presencia de inductor. Por tanto, el primer cromosoma será incapaz de producir enzima alguna. Sin embargo, el segundo cromosoma posee [illegible] operador alterado (O^c) y puede generar enzimas tanto en ausencia como en presencia de inductor. En este cromosoma, sólo el gen [illegible] es normal, de manera que los datos de su tabla serán «–, –, [illegible]



PROBLEMAS

1. Explique por qué las mutaciones I^- del sistema *lac* son normalmente recesivas frente al alelo silvestre I^+, y por qué I^+ es recesivo frente a mutaciones I^S.

2. ¿Qué significa que las mutaciones O^C del sistema *lac* son dominantes en *cis*?

3. Los genes que se muestran en la tabla siguiente corresponden al operón *lac* de *E. coli*. Los símbolos *a*, *b* y *c* representan el gen del represor (*I*), la región operadora (*O*) y el gen estructural de la β-galactosidasa (*Z*), aunque no necesariamente en ese orden. Además, el orden en que están escritos los símbolos en los genotipos tampoco es necesariamente la secuencia real del operón *lac*.

Genotipo	ACTIVIDAD (+) O INACTIVIDAD (-) DEL GEN *Z*: Sin inductor	Con inductor
$a^-b^+c^+$	+	+
$a^+b^+c^-$	+	+
$a^+b^-c^-$	−	−
$a^+b^-c^-/a^-b^+c^-$	+	+
$a^+b^+c^+/a^-b^-c^-$	−	+
$a^+b^+c^-/a^-b^-c^+$	−	+
$a^-b^+c^-/a^-b^-c^-$	+	+

a. Indique qué símbolos (*a*, *b* o *c*) representan cada uno de los elementos genéticos *lac I*, *O* y *Z*.

b. En la tabla, el superíndice «−» al lado del símbolo de un elemento genético indica un mutante, pero ya debe saber que existen algunos comportamientos mutantes en este sistema que reciben una designación especial. Utilice los símbolos convencionales del operón *lac* para designar cada genotipo de la tabla.

(El problema 3 es original de J. Kuspira y G. W. Walker, *Genetics: Questions and Problems*. Copyright © 1973, McGraw-Hill.)

4. El mapa del operón *lac* es:

I POZY

La región promotora (*P*) es el sitio donde se inicia la transcripción mediante la unión de la polimerasa de RNA antes de que realmente se produzca el mRNA. Los promotores alterados por mutación (P^-) impiden aparentemente la unión de la polimerasa de RNA. Pueden hacerse ciertas predicciones sobre el efecto de las mutaciones P^-. Utilice sus propias predicciones y su conocimiento del sistema de la lactosa para completar la tabla siguiente. Inserte un signo «+» donde se produzca enzima y un signo «−» en caso contrario.

Apartado	Genotipo	β-GALACTOSIDASA: Sin lactosa	Con lactosa	PERMEASA: Sin lactosa	Con lactosa
Ejemplo	$I^-P^+O^+Z^+Y^+/I^+P^+O^+Z^-Y^+$	−	+	−	+
a.	$I^-P^+O^cZ^+Y^-/I^+P^+O^+Z^-Y^+$				
b.	$I^+P^-O^cZ^-Y^-/I^-P^+O^cZ^+Y^-$				
c.	$I^SP^+O^+Z^+Y^-/I^-P^+O^+Z^-Y^+$				
d.	$I^SP^+O^+Z^+Y^+/I^-P^+O^+Z^-Y^+$				
e.	$I^-P^+O^cZ^-Y^-/I^-P^-O^+Z^-Y^+$				
f.	$I^-P^-O^+Z^+Y^+/I^-P^+O^cZ^+Y^-$				
g.	$I^-P^+O^+Z^-Y^+/I^-P^+O^+Z^+Y^-$				

5. En un organismo eucariótico haploide, se están estudiando dos enzimas que realizan transformaciones secuenciales de un nutriente A aportado en el medio:

$$A \xrightarrow{E_1} B \xrightarrow{E_2} C$$

El tratamiento de las células con mutágenos produce tres tipos de mutantes diferentes con respecto a estas funciones. Los mutantes del tipo 1 no muestran la función E_1; todas estas mutaciones tipo 1 cartografían en un único locus correspondiente al grupo de ligamiento II. Las mutaciones del tipo 2 provocan ausencia de la función E_2; todas ellas cartografían en el grupo de ligamiento VIII. Los mutantes de tipo 3 no muestran las funciones E_1 ni E_2; todas las mutaciones de tipo 3 cartografían en un único locus del grupo de ligamiento I.

a. Compare este sistema con el operón *lac* de *E. coli*, señalando las similitudes y las diferencias. (Asegúrese de describir todos los mutantes al nivel molecular.)

b. Si fuera a intensificar la búsqueda de mutantes, ¿esperaría encontrar otros tipos de mutantes según su modelo? Explique su respuesta.

6. En *Neurospora*, todos los mutantes afectados en la sintetasa del carbamilfosfato y en la transcarbamilasa del aspartato están alterados en el locus *pyr-3*. Al inducir mutaciones en *pyr-3* con ICR-170 (un mutágeno químico), encuentra mutantes que carecen de ambas funciones o mutantes a los que les falta sólo la función transcarbamilasa; en ningún caso falta la actividad sintetasa cuando la transcarbamilasa está presente (se supone que ICR-170 in-

duce desfases). Interprete estos resultados en términos de un posible operón.

7. En 1972, Suzanne Bourgeois y Alan Jobe demostraron que un derivado de la lactosa, la alolactosa, era el inductor natural del operón *lac*, más que la propia lactosa. La lactosa es convertida en alolactosa por la enzima β-galactosidasa. ¿Cómo explica este resultado el descubrimiento temprano de que muchas mutaciones Z^- no polares no permitían la inducción por lactosa de la permeasa y la transacetilasa *lac*?

8. Ciertas mutaciones *lacI* eliminan la unión del represor *lac* al operador pero no afectan a la agregación de las subunidades para formar el tetrámero, que es la forma activa del represor. Estas mutaciones son parcialmente dominantes sobre el tipo silvestre. ¿Puede explicar el fenotipo parcialmente I^- de los heterodiploides I^-/I^+?

9. Explique las diferencias fundamentales entre control positivo y negativo.

10. Los mutantes *lacY*$^-$ pueden sintetizar β-galactosidasa. Sin embargo, aunque el gen *lacI* esté intacto, no se puede inducir β-galactosidasa añadiendo lactosa al medio. ¿Cómo puede explicarse este resultado?

11. ¿Qué analogías encuentra entre los factores que activan en *trans* la transcripción en procariotas y en eucariotas? Indique un ejemplo.

12. Compare la disposición de los sitios de acción *cis* de las regiones controladoras de eucariotas y procariotas.

13. Explique de qué forma los modelos para los operones bacterianos tipo *ara* están relacionados con las proteínas eucarióticas de acción *trans* y su mecanismo de acción.

14. Se sabe que el represor Lac de *E. coli* contiene una cremallera de leucina en la región carboxi-terminal de la proteína, que es necesaria para que los dímeros se asocien en tetrámeros. Se sabe también que existe una secuencia operadora débil, O_2, cerca del inicio del gen Z, a la que puede unirse el represor, además de al operador O_1 normal. En el siguiente esquema se muestran estos elementos:



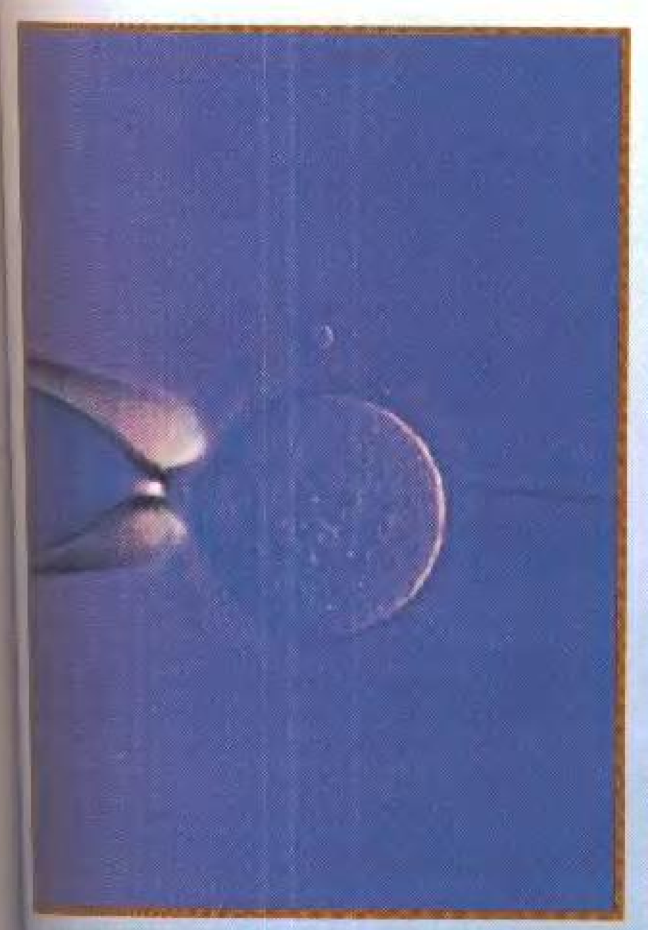
Utilizando las Figuras 11-16 y 11-38 como referencia, diseñe un modelo que explique por qué las mutaciones en *lacI* que eliminan la cremallera de leucina reducen la capacidad del represor para bloquear completamente la transcripción del operón *lac*. Dibuje un esquema.

15. Una interesante mutación en *lacI* da lugar a un represor con una capacidad 100 veces mayor de unión a DNA, independientemente de si éste contiene o no secuencias operadoras. Estos represores muestran una curva de inducción «invertida», permitiendo la síntesis de β-galactosidasa en *ausencia* del inductor (IPTG), pero reprimiendo parcialmente la expresión de β-galactosidasa en *presencia* de IPTG. ¿Cómo puede explicar esto? Observe que cuando el IPTG se une al represor, no destruye completamente su afinidad por el operador, sino que la reduce en unas 1000 veces. Además, cuando las células se dividen y se generan nuevos operadores en las cadenas hijas recién sintetizadas, el represor debe encontrar los nuevos operadores buscando a lo largo del DNA, uniéndose y disociándose rápidamente de las secuencias no operadoras.

16. Está estudiando un gen de ratón que se expresa en los riñones de los machos. Ya tiene clonado dicho gen, y le interesa ahora identificar los segmentos de DNA que controlan su expresión específica de tejido y específica de sexo. Describa una aproximación experimental que le permita conseguirlo.

12

TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE



yección de DNA foráneo dentro de una célula animal. derecha, se observa la microaguja utilizada para la inyección, a la izquierda, la micropipeta que mantiene a la célula sujeta. (© *M. Baldphoto Researchers, Inc.*)

Ideas fundamentales

El DNA recombinante se construye mediante la incorporación de un fragmento de DNA foráneo en una molécula pequeña capaz de replicarse (por ejemplo, un plásmido bacteriano) y de amplificar el fragmento incorporado en ella, dando lugar a un clon molecular del DNA insertado.

Las enzimas de restricción cortan el DNA en sitios diana específicos; tras el corte, se generan fragmentos concretos con extremos cohesivos apropiados para su inserción en un vector que haya sido cortado con la misma enzima.

Una colección de clones de DNA que sea representativa de todo el genoma de un organismo se denomina genoteca genómica.

Se pueden detectar clones individuales de una genoteca utilizando sondas que reconozcan específicamente un DNA o su producto proteico, o mediante transformación de un mutante nulo.

Es posible separar los diferentes fragmentos producidos tras digestión con una enzima de restricción porque migran en función de su tamaño cuando se someten a electroforesis en gel.

Una vez que las moléculas de DNA digerido con enzimas de restricción o las moléculas de RNA se han separado por electroforesis en gel, se pueden detectar moléculas específicas mediante la utilización de sondas.

Los sitios diana para las enzimas de restricción pueden situarse en un mapa y constituyen marcadores que son muy útiles para la manipulación del DNA.

Un gen puede aislarse mediante el análisis secuencial de clones contiguos parcialmente solapados, partiendo de un marcador ligado.

Tras la clonación de un gen, puede determinarse su secuencia nucleotídica, y esta secuencia puede utilizarse para estudiar su función y su evolución.

Una secuencia concreta puede amplificarse utilizando un par de cebadores que delimiten la secuencia de interés.

El objetivo global de la Genética es el análisis de la estructura y función de los genes y de los genomas. Desde la época de Mendel, se han identificado muchos genes mediante el análisis de segregaciones fenotípicas en cruzamientos controlados. Las primeras evidencias sobre la función de los genes surgieron de la observación de correlaciones entre determinadas mutaciones y la deficiencia de una enzima o de otro tipo de proteína. Nuestra comprensión sobre la estructura y función de los genes experimentó un avance notable cuando se estableció la relación entre la presencia de mutaciones en un gen y la presencia de cambios aminoacídicos específicos en la proteína correspondiente. Estos conocimientos, sumados al descubrimiento de la naturaleza del DNA y del código genético, pusieron de manifiesto la naturaleza básica del gen. No obstante, el concepto de gen se había fraguado únicamente a partir de inferencias *indirectas*, pues nunca se había aislado un gen y analizado directamente su secuencia. De hecho, parecía imposible que tal hazaña pudiera llevarse a cabo.

Aunque el aislamiento de DNA a partir de un tejido vivo es un proceso relativamente fácil, en el tubo de ensayo el DNA tiene la consistencia de una masa muy viscosa. ¿Cómo podría aislarse un gen específico entre esta «masa de hilos enredados»? La tecnología del DNA recombinante lo ha hecho factible, y en la actualidad se aíslan genes y otras partes del genoma rutinariamente.

¿Por qué es tan importante que podamos aislar genes individuales? En primer lugar, porque el aislamiento de un gen permite la determinación de su secuencia nucleotídica. A partir de esta información pueden establecerse los rasgos característicos de un gen, por ejemplo, el número de intrones y su posición. La comparación entre las secuencias de DNA de diferentes genes puede proporcionar información sobre su evolución. Mediante la conversión de la secuencia de nucleótidos a la secuencia de aminoácidos dictada por el código genético, puede determinarse directamente la estructura del producto proteico de un gen; y, a partir de estos datos, a menudo puede inferirse la función del gen. También puede estudiarse la función mediante modificación directa de una parte de la secuencia del DNA del gen, seguida de su reinserción en el genoma. Además, podemos trasladar un gen de un organismo a otro y generar así organismos **transgénicos**, que se utilizan tanto en investigación básica como aplicada. Una de sus aplicaciones ha sido la producción de sustancias de interés para la humanidad tales como la insulina, a partir de bacterias portadoras del gen humano adecuado. Esta breve revisión ilustra la importancia del aislamiento de genes como herramienta indispensable del análisis genético moderno.

¿Qué genes podría ser interesante aislar? La respuesta depende en gran medida del proceso biológico que se esté estudiando. Analicemos unos cuantos casos. Un genetista que investigue sobre la ruta de síntesis del triptófano en hongos estaría interesado en aquellos genes que, cuando se mutan, confieren auxotrofía para triptófano, ya que cada uno de estos genes sería responsable de un paso concreto de la ruta biosintética (véase el Cap. 10). Estos genes podrían identificarse mediante mutación, segregación y análisis de ligamiento, y denominarse *trp1*, *trp2*, *trp3*, etcétera. El genetista en cuestión estaría muy interesado en el aislamiento y la caracterización de uno o más de estos genes. Asimismo, por motivos médicos y biológicos, los genes humanos cuyas mutaciones confieren algún tipo de desorden funcional suscitan interés. Ya vimos que estos genes pueden identificarse mediante el análisis de genealogías. En los Capítulos 2 y analizamos dos ejemplos de enfermedades autosómicas recesivas: el albinismo y la alcaptonuria. Aunque en ambos casos se conoce desde hace tiempo la naturaleza general del defecto (ambos son defectos enzimáticos), sería bastante útil poder aislar los genes implicados. Mediante el análisis de genealogías se han identificado otros genes humanos cuya función bioquímica se desconoce. En este caso, el aislamiento del gen correspondiente podría resultar particularmente útil, ya que la caracterización de su estructura podría contribuir a determinar su función y la naturaleza de la enfermedad. La fibrosis quística es un buen ejemplo: del análisis de genealogías, se había concluido que se trataba de una enfermedad autosómica recesiva, pero la función del gen implicado no se desveló hasta que se aisló y secuenció dicho gen. Existen ejemplos similares en prácticamente todos los organismos que se usan en investigación.

En nuestro tratamiento de los métodos de aislamiento de genes, abordaremos en primer lugar la naturaleza del DNA recombinante y cómo esta tecnología permite el aislamiento de un gen. Posteriormente, analizaremos diferentes métodos para aislar genes específicos, como los que acabamos de discutir.

Construcción de DNA recombinante

¿Cuáles son los principios de la tecnología del DNA recombinante? El organismo en estudio, donante del DNA que se va a analizar, se denomina **organismo donante**. El procedimiento básico consiste en extraer el DNA del organismo donante, cortarlo en fragmentos que contengan entre uno y varios genes e insertar cada uno de estos fragmentos en una molécula que se replique autónomamente, por ejemplo, un plásmido bacteriano. Estas pequeñas moléculas circulares funcionan a modo de transportadores o **vectores** de estos fragmentos de DNA. Las moléculas de vector con sus insertos se denominan **DNA recombinante**, porque constituyen combinaciones nuevas de DNA con una parte de genoma donante (que puede proceder de cualquier organismo) y otra parte de DNA vector cuyo origen es completamente diferente (normalmente, un plásmido bacteriano o un virus). La mezcla de DNA recombinante se utiliza para transformar células bacterianas, que suelen incorporar una única molécula de vector recombinante. Después de la transformación, las células bacterianas se siembran en medio sólido para que desarrollen colonias individuales. Una célula bacteriana transformada con una sola molécula de DNA recombinante se dividirá y dará lugar a una colonia con millones de células, todas ellas portadoras del mismo vector recombinante. Así, una colonia individual contiene una población numerosa de insertos de DNA idénticos, que se denomina **clon de DNA**. Una parte considerable del análisis de un fragmento clonado puede realizarse mientras se encuentra en la bacteria hospedadora, aunque un objetivo posterior suele ser su reintroducción en el organismo donante original para manipular la estructura y función del genoma. Por ello, el protocolo suele constar de los siguientes pasos:

Identificación del gen donante de interés mediante cruzamientos
↓
Clonación del gen de interés en una bacteria
↓
Caracterización del gen donante en el sistema bacteriano
↓
Modificación del gen donante
↓
Reintroducción del gen en las células donantes originales

COROLARIO

La clonación permite la amplificación y el aislamiento de un segmento específico de DNA a partir de una muestra compleja de DNA como, por ejemplo, un genoma.

Puesto que el DNA donante se cortó en muchos fragmentos diferentes, la mayoría de las colonias serán portadoras de una molécula diferente de DNA recombinante (es decir, un inserto diferente). Por tanto, el siguiente paso consiste en encontrar la manera de seleccionar el clon portador del inserto que nos interesa. Una vez que se obtiene este clon, se aísla el DNA en masa y el gen de interés clonado puede someterse a una serie de análisis, que consideraremos más adelante en este capítulo. Advierta que el método de clonación funciona debido a que en cada célula bacteriana transformada entra una única molécula recombinante y a que estas células se encargan de amplificarlas en poblaciones constituidas por un número elevado de moléculas susceptibles de ser tratadas como si fueran compuestos químicos. La Figura 12-1 muestra un esquema general de esta estrategia.

El término *DNA recombinante* no debe confundirse con los DNA recombinantes naturales que se originan por recombina-

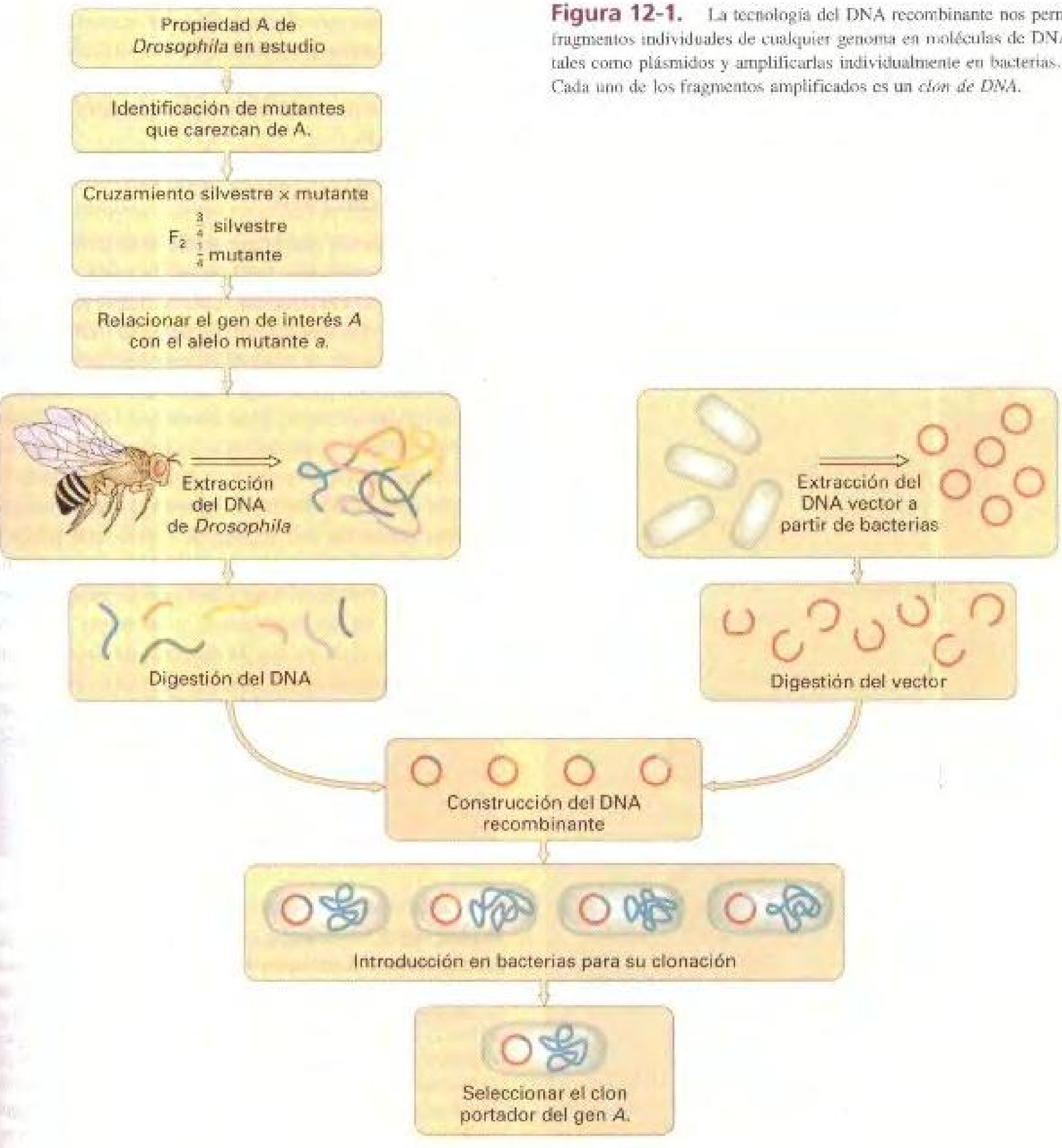
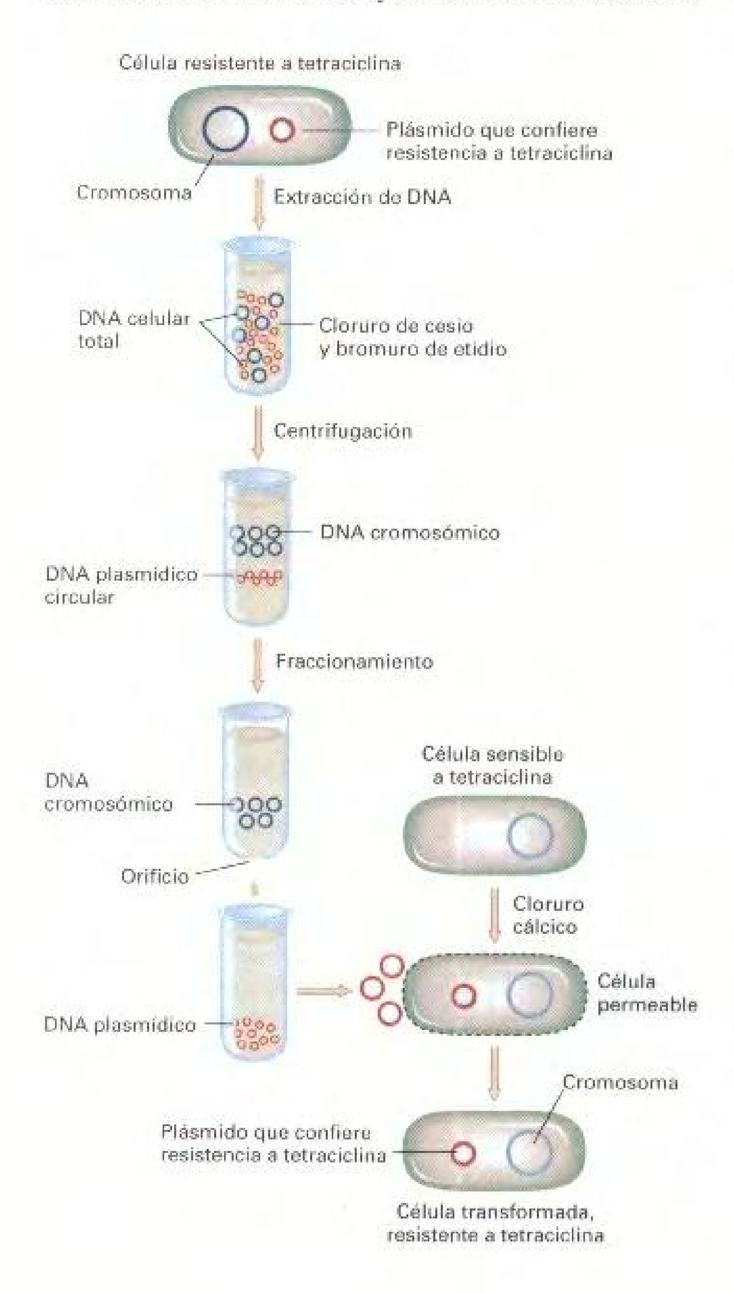


Figura 12-1. La tecnología del DNA recombinante nos permite insertar fragmentos individuales de cualquier genoma en moléculas de DNA vector tales como plásmidos y amplificarlas individualmente en bacterias. Cada uno de los fragmentos amplificados es un *clon de DNA*.

ción entre cromosomas homólogos tanto en eucariotas como en procariotas. El DNA recombinante al que nos referimos en este capítulo se genera mediante la unión artificial de moléculas de DNA no homólogas que suelen proceder de organismos diferentes. Algunos genetistas prefieren utilizar el término **DNA quimérico**, en honor al monstruo de la mitología griega denominado Quimera. Una Quimera siempre ha simbolizado una unión biológica imposible, es decir, una asociación de partes procedentes de diferentes animales. Por ello, podemos considerar el DNA recombinante como una quimera de DNA, que no sería posible sin la manipulación experimental que conocemos como *tecnología del DNA recombinante*.

Aislamiento del DNA

El primer paso en la construcción de un DNA recombinante es el aislamiento de los DNA donante y vector. Décadas antes del desarrollo de la tecnología del DNA recombinante ya existían protocolos generales para el aislamiento de DNA. Cuando se utilizan estos métodos, la mayor parte del DNA extraído del donante es DNA nuclear genómico en eucariotas o el principal DNA genómico en procariotas; normalmente, son estos tipos de DNA los que se someten a análisis. El procedimiento que se sigue para obtener el DNA vector depende de su naturaleza. Los plásmidos bacterianos son unos vectores que se utilizan rutinariamente y que deben separarse del DNA genómico de la bacteria. La Figura 12-2 resume el protocolo de extracción de DNA plasmídico por ultracentrifugación. El DNA plasmídico forma una banda nítida después de la ultracentrifugación en un gradiente de densidad de cloruro de cesio en presencia de bromuro de etidio. Para recuperar la banda, se perfora la pared del tubo de centrífuga de plástico. Existe otro protocolo basado en la observación de que, a un pH alcalino específico, se desnaturaliza el DNA genómico bacteriano pero no el plasmídico. Cuando luego se neutraliza la muestra, el DNA genómico precipita, mientras que el plasmídico se mantiene en solución. Los fagos tales como λ también pueden utilizarse como vectores para la clonación de DNA en sistemas bacterianos. El DNA del fago se aísla a partir de una suspensión pura de fagos procedente de un lisado.



Digestión del DNA

El descubrimiento que hizo posible el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante fue la identificación y caracterización de las **enzimas de restricción**. Las bacterias producen enzimas de restricción como mecanismo de defensa frente a los fagos. Estas enzimas funcionan a modo de tijeras, cortando el DNA del fago para producir su inactivación. Lo importante es que las enzimas de restricción no cortan aleatoriamente, sino en secuencias diana específicas, una propiedad que las hace muy útiles para la manipulación del DNA. Por azar, cualquier molécula de DNA, ya sea de virus o de cualquier otro organismo hasta los seres humanos contiene sitios de restricción, de modo que puede cortarse en fragmentos definidos de tamaño adecuado para su clonación. Los sitios de restricción no desempeñan ningún papel en el funcionamiento de un organismo, y tampoco serían reconocidos como tales *in vivo*, ya que la mayoría de los organismos no producen enzimas de restricción.

Examinemos un ejemplo. La enzima de restricción *EcoRI* (de *E. coli*) reconoce la siguiente secuencia de seis pares de nucleótidos en el DNA de cualquier organismo:

5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

Figura 12-2. Los plásmidos, en este caso un plásmido portador del gen de resistencia al antibiótico tetraciclina (*arriba*), pueden separarse del DNA cromosómico bacteriano. Diferencias en la unión al bromuro de etidio de las dos especies de DNA hacen que el plásmido sea más denso que el DNA cromosómico y forme una banda separada tras centrifugación en un gradiente de cloruro de cesio (*abajo a la izquierda*). Una vez purificados pueden introducirse en las células bacterianas por transformación (*a la derecha*). (Modificado de S. N. Cohen, «The Manipulation of Genes.» Copyright © 1975 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)



Figura 12-3. La enzima de restricción *Eco*RI corta una molécula circular de DNA que tiene un sitio de reconocimiento para dicha enzima, dando lugar a una molécula lineal con extremos cohesivos.

Este tipo de secuencia se denomina **palíndrome** de DNA, para indicar que las dos cadenas tienen la misma secuencia nucleotídica pero en una orientación antiparalela. La mayoría de las enzimas de restricción reconocen y cortan palíndromes específicos. La enzima EcoRI corta de forma escalonada entre los nucleótidos G y A de ambas cadenas:

```
5´-GAATTC-3´         5´-G        AATTC-5´
             ⟶
3´-GTTAAG-5´         3´-CTTAA        G-5´
```

Este corte escalonado genera un par de «extremos cohesivos» idénticos. Se dice que los extremos son *cohesivos* porque pueden formar puentes de hidrógeno (unirse) con una secuencia complementaria. La Figura 12-3 muestra la digestión con *Eco*RI de una molécula circular, como puede ser un plásmido, que contiene una única secuencia diana: el corte produce la apertura del círculo, y la molécula lineal resultante tiene dos extremos cohesivos. La producción de estos extremos cohesivos es otra propiedad de las enzimas de restricción que tiene aplicación en la tecnología de DNA recombinante. La idea es la siguiente: si dos moléculas de DNA se cortan con la misma enzima de restricción, ambas producirán fragmentos con los mismos extremos cohesivos complementarios, lo que permite la formación de quimeras de DNA. Así, si se cortan el DNA vector y el donante con *Eco*RI, y se mezclan, los extremos cohesivos del vector podrán unirse con los extremos cohesivos de los fragmentos donantes.

COROLARIO

Las enzimas de restricción presentan dos propiedades que resultan útiles en la tecnología del DNA recombinante. En primer lugar, cortan el DNA en fragmentos de tamaño adecuado para su clonación. En segundo lugar, muchas enzimas de restricción producen cortes escalonados que generan extremos cohesivos de cadena sencilla, y estos extremos permiten la formación de DNA recombinante.

Actualmente, se conocen docenas de enzimas de restricción con diferente especificidad de secuencia, algunas de las cuales se muestran en el Cuadro 12-1. Advertirá que todas las secuencias diana son palíndromes, pero que hay enzimas, como EcoRI, que producen cortes escalonados, mientras que otras producen cortes «limpios» que generan extremos romos. Incluso los extremos romos pueden utilizarse para construir DNA recombinante.

El DNA también puede fragmentarse mecánicamente. Por ejemplo, si el DNA se agita en una batidora, los cromosomas de gran tamaño se romperán en fragmentos con extremos romos que pueden clonarse.

Ligación del DNA

Lo más común es que el DNA vector y el DNA donante se digieran con una enzima de restricción que genere extremos cohesivos y luego se mezclen en un tubo de ensayo para permitir que los extremos cohesivos de ambos DNA se unan y formen moléculas recombinantes. La Figura 12-4*a* muestra un plásmido vector portador de un único sitio de restricción para *Eco*RI, de manera que la digestión con la enzima *Eco*RI convierte la molécula circular en una molécula de DNA lineal con extremos cohesivos. DNA de cualquier otro origen (p. ej., de *Drosophila*) se trata

CUADRO 12-1. Sitios de reconocimiento, corte y modificación de varias enzimas de restricción

Enzima	Organismo productor	Diana de restricción en el DNA de cadena doble
*Eco*RI	*Escherichia coli*	↓ m 5′ -G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G- 5′ m ↑
*Eco*RII	*E. coli*	↓ m 5′ -G-C-C-T-G-G-C- -C-G-G-A-C-C-G- 5′ m ↑
*Hind*II	*Haemophilus influenzae*	↓ m 5′ -G-T-Py-Pu-A-C- -C-A-Pu-Py-T-G- 5′ m ↑
*Hind*III	*H. influenzae*	m↓ 5′ -A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A- 5′ ↑m
*Hae*III	*H. aegyptius*	↓ 5′ -G-G-C-C- -C-C-G-G- 5′ ↑
*Hpa*II	*H. parainfluenzae*	↓ 5′ -C-C-G-G- -G-G-C-C- 5′ ↑
*Pst*I	*Providencia stuartii*	↓ 5′ -C-T-G-C-A-G- -G-A-C-G-T-C- 5′ ↑
*Sma*I	*Serratia marcescens*	↓ 5′ -C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C- 5′ ↑
*Bam*I	*Bacillus amyloliquefaciens*	↓ 5′ -G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G- 5′ ↑
*Bgl*II	*B. globiggi*	↓ 5′ -A-G-A-T-C-T- -T-C-T-A-G-A- 5′ ↑

Nota: suele utilizarse un asterisco (*) para indicar los sitios de metilación, aunque aquí se utiliza una «m», para evitar confusión con el símbolo que denota marcaje radiactivo.

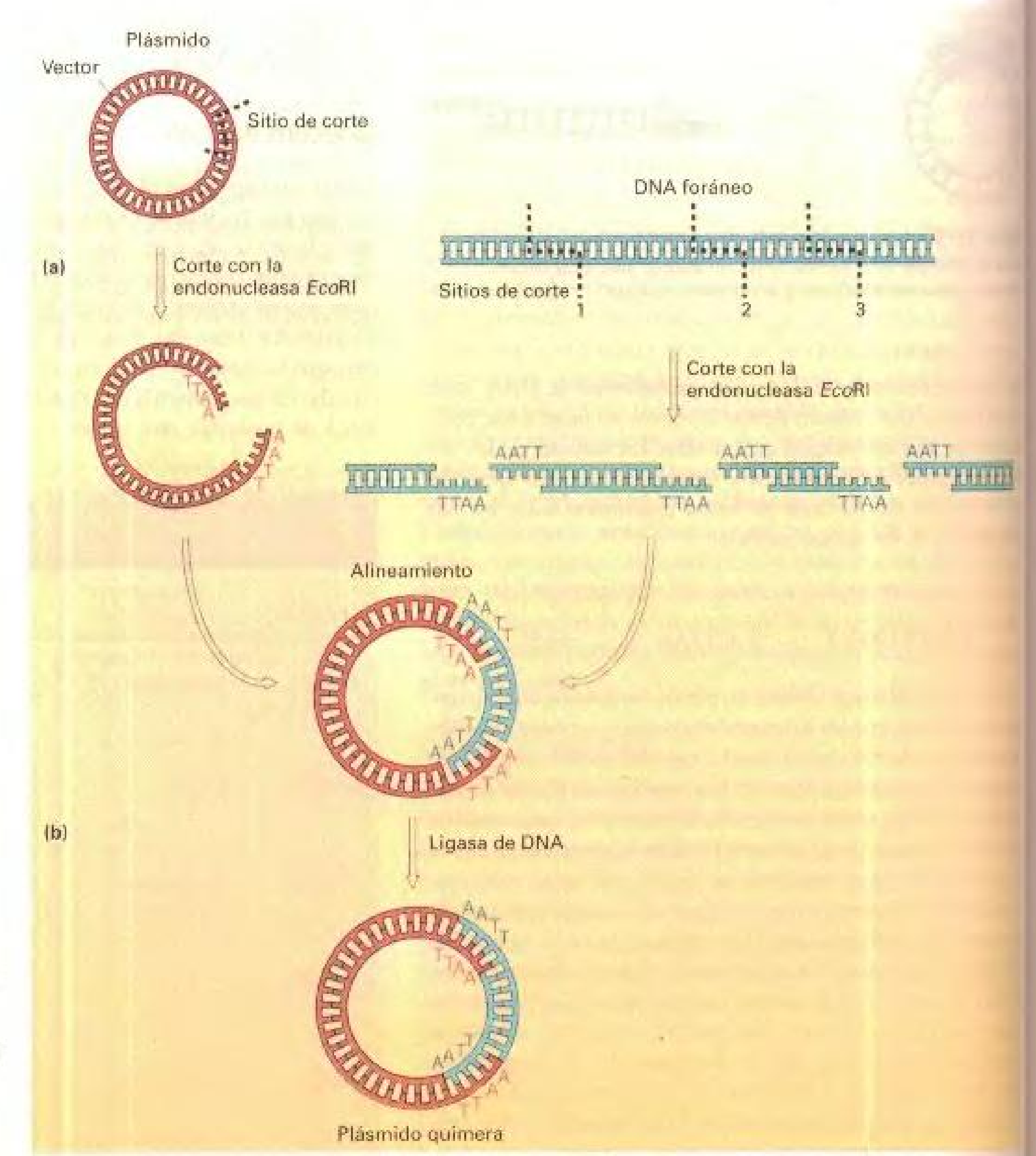


Figura 12-4. Método para la construcción de un plásmido quimérico portador de genes derivados de un DNA foráneo. (Tomado de S. N. Cohen, «The Manipulation of Genes.» Copyright © 1975 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

también con la enzima *Eco*RI para producir una población de fragmentos con los mismos extremos cohesivos. Cuando se mezclan las dos poblaciones, las moléculas de DNA vector pueden unirse con fragmentos de DNA donante mediante la formación de segmentos de doble hélice entre sus extremos cohesivos. Debido a que hay muchas moléculas lineales de vector en la solución, y muchos fragmentos *Eco*RI diferentes de DNA donante, se producirá una diversidad de moléculas recombinantes. En esta etapa, aunque los extremos cohesivos han hibridado y generado una población de moléculas quiméricas, los esqueletos azúcar fosfato presentan discontinuidad en cada uno de los puntos de unión. No obstante, es posible sellar los extremos mediante la adición de la enzima **DNA ligasa,** que crea enlaces fosfodiésteres en los puntos de unión (Fig. 12-4*b*). Algunas ligasas pueden ligar incluso fragmentos de DNA con extremos romos.

Amplificación del DNA recombinante

El DNA recombinante, una vez ligado, se introduce en una cé-la bacteriana mediante transformación. Dentro de la célula re-ceptora, el vector plasmídico se replica, ya que los plásmidos suelen tener un origen de replicación. Además, ahora que el DNA donante se encuentra integrado en el plásmido, su DNA se replica automáticamente cuando se replica el DNA vector. Cada plásmido recombinante que penetre en una célula dará lugar a múltiples copias de sí mismo en esa célula. Posteriormente, ocu-rrirán muchos ciclos de división celular, y los vectores recombi-nantes experimentarán más rondas de replicación. La colonia bacteriana resultante contendrá millones de copias de un inserto concreto de DNA donante. El conjunto de copias amplificadas de un fragmento de DNA donante se conoce como clon de DNA (Fig. 12-5).

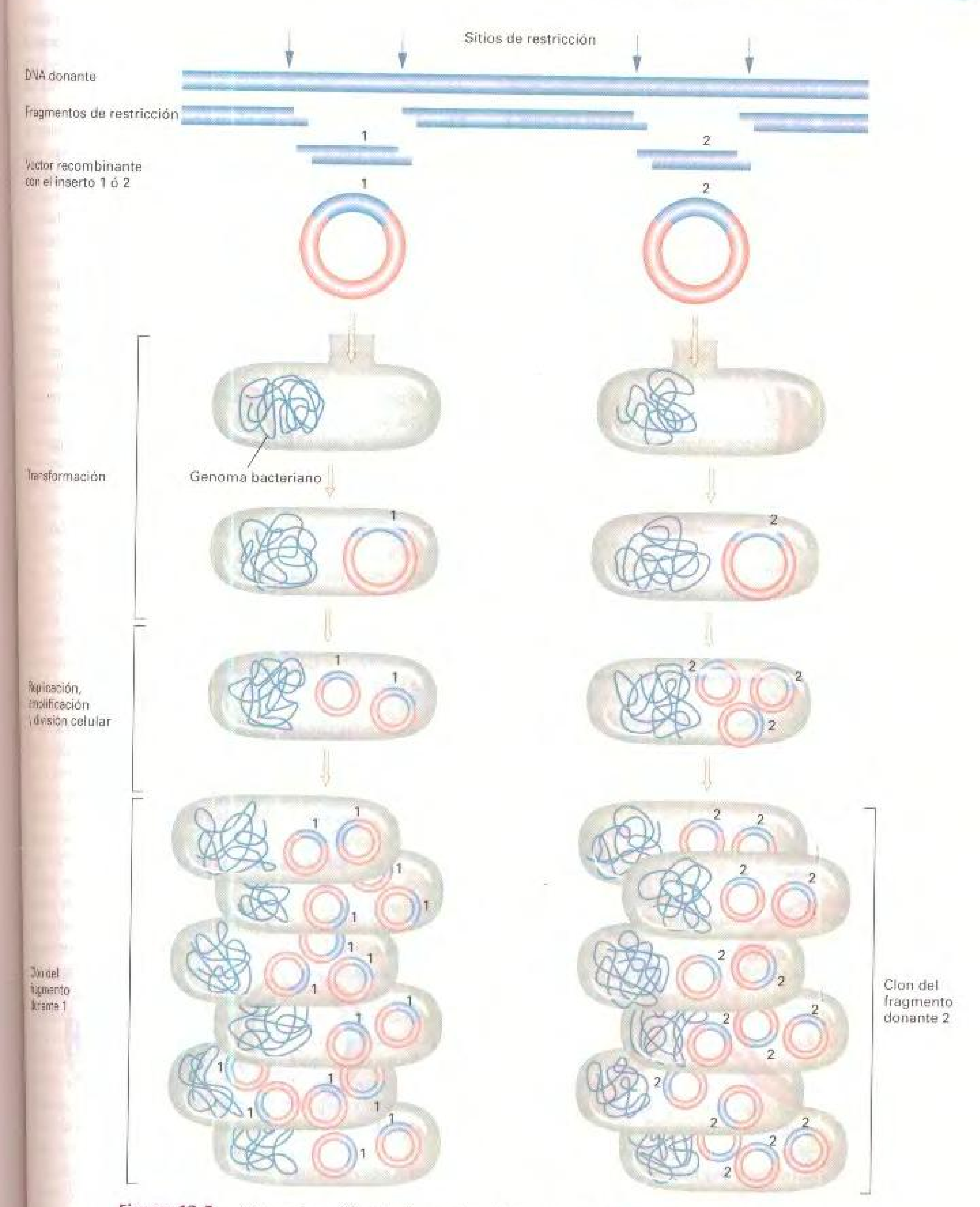


Figura 12-5. Así ocurre la amplificación. El tratamiento del DNA donante y vector con enzimas de restricción permite la inserción de fragmentos individuales en el vector. Tras la entrada de una sola molécula recombinante en la célula bacteriana, la replicación y la división celular producen un número elevado de copias del fragmento donante.

Clonación de un gen específico

En los apartados precedentes hemos descrito aproximaciones genéricas para la construcción de DNA recombinante. Sin embargo, en la práctica, los genetistas están interesados en aislar y caracterizar genes concretos, por lo que los procedimientos deben de adaptarse para permitir la clonación de un fragmento de DNA que contenga el gen de interés. Los detalles del proceso difieren de un organismo a otro y de un gen a otro. Un fac inicial importante es la elección de un vector adecuado para el proyecto que uno se proponga realizar.

Elección del vector de clonación

Los vectores deben ser moléculas relativamente pequeñas, par que sean fáciles de manipular. También deben ser capaces d

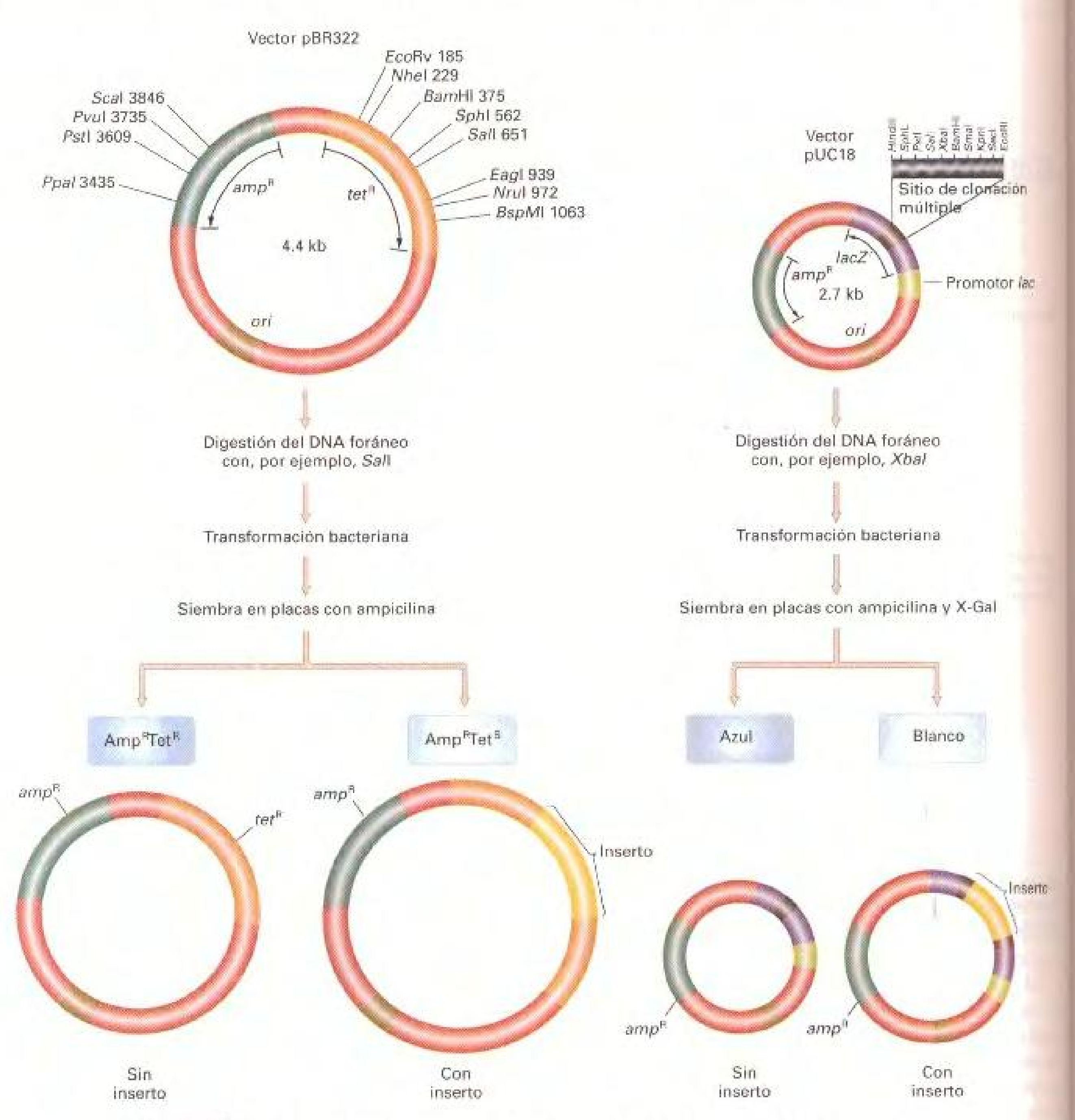


Figura 12-6. Esquema de la estructura general y los sitios de restricción de dos plásmidos diseñados para ser empleados como vectores de clonación de DNA. La inserción en pBR322 se detecta por la inactivación de un gen de resistencia a tetraciclina (tet^R), que provoca el fenotipo de sensibilidad Tet^S. La inserción en pUC18 se detecta por la inactivación de la función β-galactosidasa del gen Z', que se traduce en la incapacidad para convertir el sustrato artificial X-Gal en un compuesto de color azul.

proliferar en una célula viva y permitir así la amplificación del fragmento donante insertado. Otro requerimiento importante es que contenga sitios de restricción convenientes para la inserción del DNA que se desea clonar. Los sitios de restricción únicos son los más útiles porque permiten dirigir la inserción de DNA donante a un sitio específico del vector. También es importante que ofrezca un mecanismo para la identificación y la recuperación de las moléculas recombinantes. Actualmente, hay muchos vectores de clonación disponibles, y la elección entre ellos suele depender del tamaño del segmento de DNA que se desea clonar. Consideraremos algunos de uso muy común.

Plásmidos. Como describimos anteriormente, los plásmidos bacterianos son moléculas circulares pequeñas, separadas del cromosoma bacteriano principal. Replican su DNA con independencia del cromosoma bacteriano. Se han encontrado muchos tipos distintos de plásmidos en bacterias. La distribución de cualquier plásmido dentro de una especie suele ser esporádica; algunas células son portadoras del plásmido y otras no. En el Capítulo 7, consideramos el plásmido F, que confiere ciertas propiedades conjugativas a las células de *E. coli*. El plásmido F puede utilizarse como vector de fragmentos grandes de DNA donante, como veremos en el Capítulo 14. Sin embargo, los plásmidos que se utilizan rutinariamente como vectores son aquellos que son portadores de genes de resistencia a antibióticos. Los genes de resistencia a antibióticos son muy útiles porque el fenotipo de resistencia sirve para seleccionar no sólo las células transformadas con plásmido, sino también los vectores que contienen DNA recombinante. Además, los plásmidos son un medio eficaz para amplificar DNA clonado, ya que existen muchas copias por célula, hasta varios centenares para algunos plásmidos.

En la Figura 12-6 se muestran dos vectores plasmídicos que se han utilizado ampliamente en los estudios genéticos. Estos vectores derivan de plásmidos naturales, pero ambos han sido modificados genéticamente para facilitar su uso como vectores de DNA recombinante. El plásmido pBR322 presenta una estructura más sencilla y contiene dos genes de resistencia a antibióticos: tet^R y amp^R. Ambos genes contienen sitios de restricción únicos que resultan muy útiles para la clonación. Por ejemplo, podría elegirse el gen tet^R para insertar el DNA donante. Una inserción en el gen tet^R producirá su inactivación y la pérdida de la resistencia a tetraciclina, de manera que las células se volverán sensibles a la droga. Por ello, el procedimiento de clonación consistiría en mezclar las muestras de vector y DNA donante digeridos, transformar bacterias y seleccionar colonias resistentes a ampicilina, que deben haber sido transformadas con una molécula de plásmido. De las colonias Amp^R, sólo aquellas que además sean sensibles a tetraciclina portarán inserto; en otras palabras, las colonias Amp^R Tet^S serán las que contengan DNA recombinante. Para averiguar qué clon es portador de un inserto concreto hay que realizar experimentos adicionales.

El plásmido pUC es un vector más avanzado, cuya estructura permite la visualización directa de las colonias portadoras de DNA recombinante. El elemento clave es una pequeña parte del gen que determina la β-galactosidasa de *E. coli*. En esta región, se ha insertado un fragmento de DNA denominado **sitio de clonación múltiple**, que contiene muchos sitios de restricción únicos para facilitar la clonación. El sitio de clonación múltiple no altera la fase de lectura del fragmento de β-galactosidasa y tampoco interfiere con su traducción. El protocolo de transformación utiliza células portadoras de un gen para la β-galactosidasa que carece del fragmento presente en el plásmido. Ocurre un tipo de complementación poco habitual, en el que las proteínas parciales determinadas por ambos fragmentos se unen y dan lugar a una enzima β-galactosidasa funcional. Cuando se añade al medio el sustrato incoloro de la β-galactosidasa denominado X-Gal, la enzima funcional convierte al sustrato en un compuesto azul, que da una tonalidad azul a la colonia. Si se inserta DNA donante en el sitio de multiclonaje, se interrumpe el fragmento de la enzima determinado por el vector, no se forma β-galactosidasa funcional y las colonias son blancas. Así, las colonias Amp^R blancas son candidatas claras a ser portadoras de DNA recombinante, y son este tipo de colonias las que se aislarían para su estudio posterior.

Los plásmidos que contienen insertos de gran tamaño tienden a perderlos espontáneamente; por ello, los plásmidos no son útiles para clonar fragmentos de DNA mayores de 20 kb.

Vectores virales. Los vectores virales, basados en la utilización del genoma de un virus para la inserción del gen o genes de interés, ofrecen muchas ventajas en la clonación de genes y su manipulación posterior. Debido a que los virus infectan a sus células hospedadoras con una eficacia elevada, el gen clonado se introduce dentro de las células con mucha más frecuencia que por el método de la transformación. Algunos vectores virales se han diseñado especialmente para permitir la síntesis de niveles elevados de los productos proteicos de los genes clonados, como es el caso de los baculovirus de insectos, cuyo uso para la expresión de genes foráneos en un sistema celular eucariótico se detalla en el Capítulo 13. Otros vectores virales, como los basados en el bacteriófago M13, han sido diseñados para facilitar la secuenciación de los genes clonados y la introducción de mutaciones en dichos genes. Los vectores derivados de los retrovirus permiten la integración estable del DNA clonado en los cromosomas de mamíferos, permitiendo la expresión estable del gen. Los vectores virales son también los vehículos elegidos en las estrategias de terapia génica. A continuación, se describen algunos ejemplos de vectores virales utilizados en bacterias.

Fago lambda. Por varios motivos, el fago λ es un vector de clonación bastante útil. En primer lugar, las cápsidas del fago empaquetan selectivamente cromosomas de unas 50 kb de longitud y, como veremos, esta propiedad resulta muy útil para seleccionar las moléculas de λ que han insertado el DNA donante. La parte central del genoma del fago no se requiere para la replicación o el empaquetamiento de las moléculas de DNA de λ en *E. coli*, así que esta parte puede cortarse con enzimas de restricción y descartarse. Los dos «brazos» se ligan con DNA donante cortado con enzimas de restricción. Las moléculas quiméricas pueden introducirse en *E. coli* por transformación o tras ser empaquetadas en cápsidas de fago *in vitro*. En el sistema *in vitro*, se mezcla el DNA y los componentes de la cápsida, y las partículas virales infectivas se forman espontáneamente. En cualquiera de los dos métodos, son las moléculas con insertos de 10 a 15 kb las

que se empaquetan más eficazmente en las cápsidas virales, ya que este tamaño de inserto sustituye a la parte central delecionada del genoma del fago y genera una molécula cuyo tamaño ronda las 50 kb. Por ello, la mera presencia de un halo en un césped bacteriano indica automáticamente la presencia de un fago recombinante portador de un inserto (Fig. 12-7). Otra propiedad útil del fago como vector es que las moléculas recombinantes se empaquetan de forma automática en partículas infectivas, que pueden almacenarse convenientemente y manejarse experimentalmente.

Fagos de cadena sencilla. Algunos fagos contienen sólo moléculas de DNA de cadena sencilla. Cuando infectan una bacteria, la cadena infectiva se convierte en una forma replicativa de cadena doble, que puede aislarse y utilizarse para clonar. La ventaja de utilizar estos fagos como vectores de clonación es que el DNA de cadena sencilla es el sustrato que se requiere para la secuenciación del DNA por la técnica de Sanger. El fago M13 es el que se utiliza más frecuentemente con este propósito.

Cósmidos. Los cósmidos son vectores híbridos entre el fago λ y un plásmido, de modo que su DNA puede replicarse en una célula como un plásmido o empaquetarse como un fago. Sin embargo, en los cósmidos pueden clonarse insertos de DNA unas tres veces más grandes que en λ (tanto como unas 45 kb de tamaño). El fundamento es que se ha delecionado la mayor parte de la

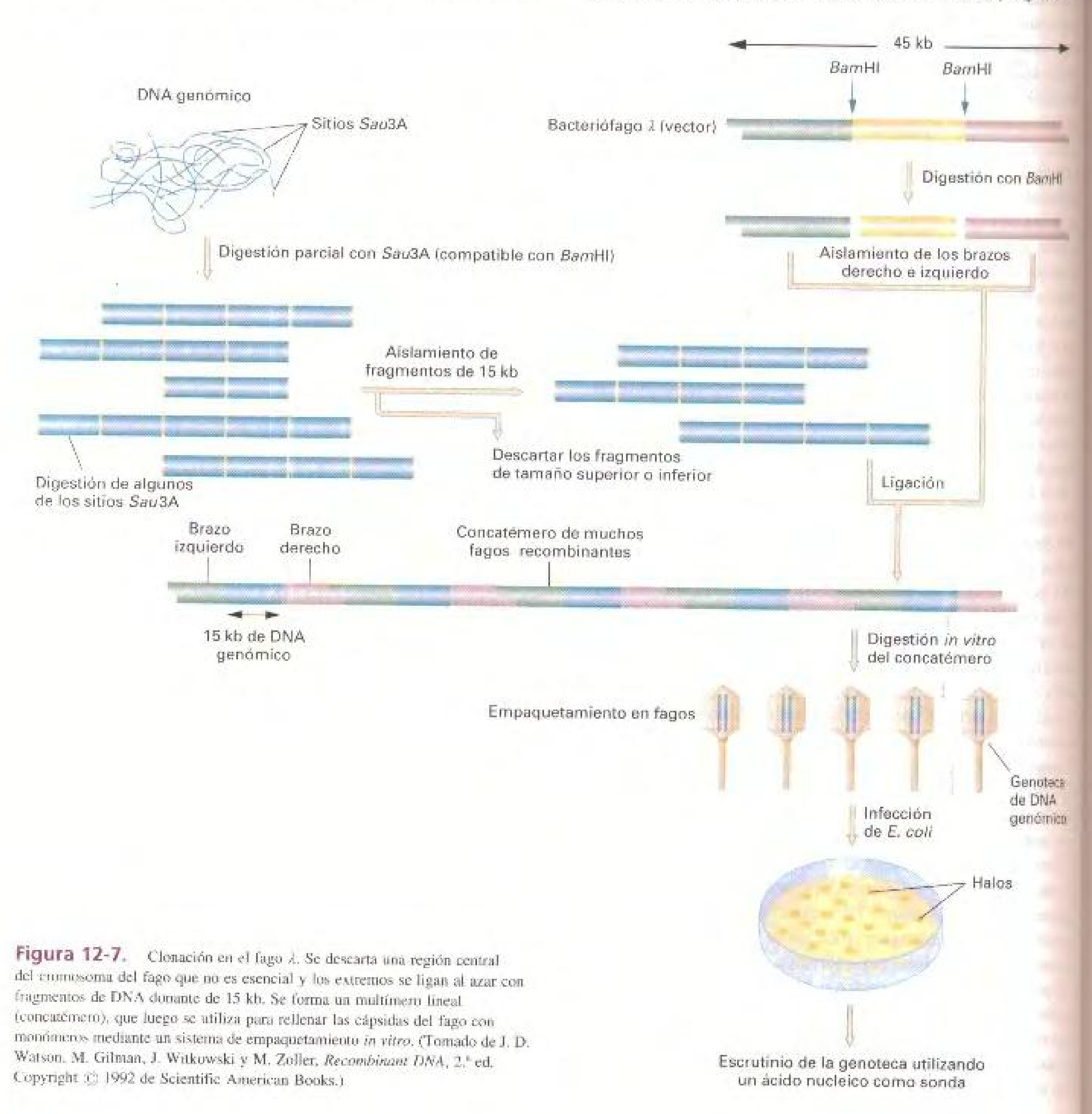


Figura 12-7. Clonación en el fago λ. Se descarta una región central del cromosoma del fago que no es esencial y los extremos se ligan al azar con fragmentos de DNA donante de 15 kb. Se forma un multímero lineal (concatémero), que luego se utiliza para rellenar las cápsidas del fago con monómeros mediante un sistema de empaquetamiento *in vitro*. (Tomado de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de Scientific American Books.)

estructura de λ, dejando las secuencias que actúan como señales de empaquetamiento (**sitios cos**). Esta estructura modificada permite que la cápsida viral se rellene casi exclusivamente con DNA donante. El DNA del cósmido se puede empaquetar en las cápsidas del fago mediante el sistema *in vitro*. La Figura 12-8 ilustra el método de clonación utilizando cósmidos.

Vectores de expresión. Una forma de identificar un gen clonado concreto es detectar el producto proteico que se expresa a partir del mismo en una célula bacteriana. Para ello, es necesario que el gen se exprese, es decir, que se transcriba y que el mRNA se traduzca a proteína. La mayoría de los vectores de clonación no permiten la expresión de los genes clonados, y se requiere el uso de vectores especiales. Sin embargo, debido a que las bacterias no procesan los intrones, previamente deben de haberse eliminado los intrones de las secuencias clonadas. El gen clonado se inserta aguas abajo de las señales necesarias para la transcripción y la traducción en bacterias. Se han diseñado algunos vectores de expresión que contienen sitios de restricción adyacentes a una región reguladora *lac*. Estos sitios de restricción permiten la clonación de DNA foráneo en el vector bajo el control del sistema regulador *lac*.

Construcción de una genoteca de DNA

Hemos visto que el principal objetivo de la tecnología del DNA recombinante es la clonación de un gen particular o de cualquier

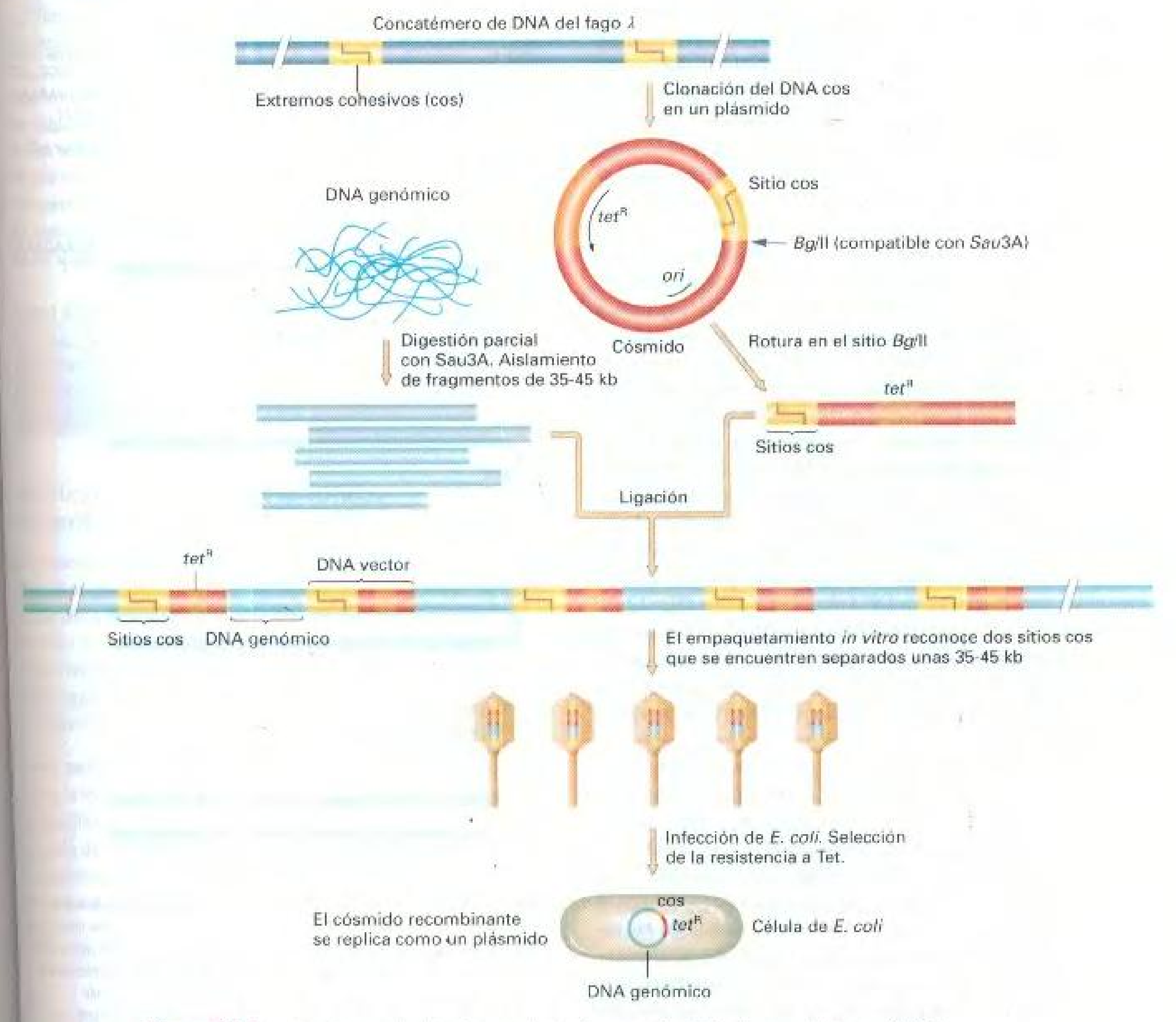


Figura 12-8. Clonación en cósmidos. Se corta el cósmido en un sitio *Bgl*II adyacente al sitio cos. El DNA genómico donante se corta con *Sau*3A, que produce extremos cohesivos compatibles con *Bgl*II. Cuando se mezclan, se obtiene una disposición en tándem de moléculas de DNA donante y vector. El fago se empaqueta *in vitro* cortando en el sitio cos. Los cósmidos que contienen inserto, una vez dentro de las células bacterianas, se circularizan. (Tomado de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de Scientific American Books.)

otro fragmento genómico de interés para el investigador. La estrategia a utilizar para la clonación de un gen específico depende en gran medida del gen en cuestión y de lo que sabemos sobre él. Generalmente, se suele comenzar con una muestra de DNA como, por ejemplo, DNA genómico eucariótico. El siguiente paso consiste en obtener una vasta colección de clones a partir de la muestra original. Esta colección de clones se denomina **genoteca de DNA**. A veces, nos referimos a este paso como «clonación por perdigonada» porque el experimentador clona una muestra amplia de fragmentos y espera que con uno de los clones se haya dado en el «blanco» y contenga el gen deseado. La tarea entonces es encontrar ese clon particular.

Hay diferentes tipos de genotecas, clasificadas, en primer lugar, según el vector que se utilice y, en segundo lugar, según el origen del DNA. Puesto que vectores de clonación diferentes pueden transportar longitudes de DNA distintas, la elección del vector para la construcción de la genoteca dependerá del tamaño del genoma (o de cualquier otra muestra de DNA) con el que se va a construir la genoteca. Los vectores plasmídicos y los fagos pueden transportar cantidades pequeñas de DNA, por lo que son útiles para clonar genes a partir de organismos cuyos genomas son pequeños. Los cósmidos pueden transportar cantidades de DNA mayores y otros vectores, como los YAC y los BAC (véanse los Caps. 13 y 14), son los que ofrecen la máxima capacidad. Otro factor importante en la elección del vector es la facilidad de manejo. Una genoteca viral es una suspensión de fagos. Una genoteca construida con plásmidos o cósmidos es una suspensión de bacterias o un conjunto de cultivos bacterianos definidos que se almacenan en tubos de ensayo o en cajas con múltiples pocillos.

La segunda decisión importante consiste en optar por construir una **genoteca genómica** o una **genoteca de cDNA**. El **cDNA**, o **DNA complementario**, es DNA sintético obtenido a partir de mRNA por la acción de una enzima especial denominada transcriptasa inversa y aislada originalmente de retrovirus. Utilizando mRNA como molde, la transcriptasa inversa sintetiza una molécula de DNA de cadena sencilla que luego puede utilizarse como molde para la síntesis de DNA de cadena doble (Fig. 12-9). Debido a que procede de copiar mRNA, el cDNA carece tanto de secuencias reguladoras como de intrones. Esto significa que el cDNA de eucariotas sí puede traducirse a proteína funcional en bacterias, un factor a considerar cuando se expresan genes eucarióticos en bacterias.

La elección entre DNA genómico y cDNA depende de la situación. Si se busca un gen concreto, que sea activo en un determinado tejido de una planta o un animal, entonces tiene sentido utilizar ese tejido para preparar mRNA, convertirlo a cDNA y preparar una genoteca de cDNA a partir de esa muestra. Una genoteca obtenida de esta manera debería estar enriquecida en el gen en cuestión. Una genoteca de cDNA está basada en las regiones del genoma que se transcriben, por lo que inevitablemente será más pequeña que una genoteca genómica completa, que debería contener todo el genoma. Aunque las genotecas genómicas incluyen un mayor número de clones, tienen la ventaja de contener los genes en su forma nativa, incluyendo los intrones y las secuencias reguladoras. Si el objetivo de construir una genoteca es el preludio de la clonación de un genoma completo, entonces se necesitará una genoteca genómica en algún momento.

En algunos casos, es posible reducir la fracción genómica que se utiliza en la construcción de una genoteca con el objetivo de facilitar la detección del gen deseado. Esta aproximación se puede realizar si el investigador ya conoce qué cromosoma contiene el gen. Una técnica que se utiliza en el análisis genético molecular de mamíferos consiste en separar los cromosomas con un instrumento denominado *citómetro de flujo*. Se hace pasar una suspensión de cromosomas por este aparato, que fracciona los cromosomas según su tamaño (esta técnica se discute con más detalle en el Cap. 14). La fracción cromosómica adecuada se utiliza para construir la genoteca.

Otra técnica aplicable a los organismos con cromosomas pequeños consiste en fraccionarlos mediante *electroforesis de campo pulsante* (PFGE: del inglés, *pulse field gel electrophoresis*

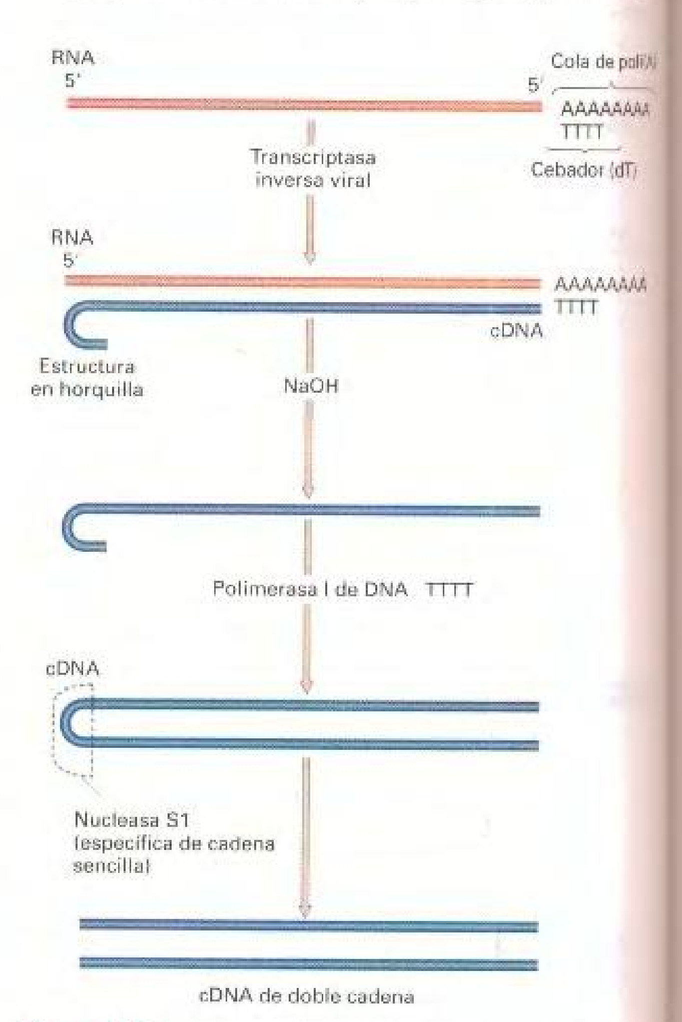


Figura 12-9. Síntesis de cDNA de doble cadena a partir de mRNA. Se añade un oligonucleótido (dT) corto para que hibride con la cola de poli(A) del mRNA y funcione como cebador de la transcriptasa inversa, que utiliza el mRNA como molde para la síntesis de una cadena de DNA complementaria. El cDNA resultante termina en una estructura en horquilla. Cuando se degrada la cadena de mRNA con NaOH, la horquilla se convierte en cebador para la polimerasa I de DNA, que genera DNA de doble cadena. La estructura en horquilla se elimina con la nucleasa S1 (que sólo actúa en la región de cadena sencilla de la horquilla), produciendo así una molécula de DNA de cadena doble. (Tomado de J. D. Watson, J. Tooze y D. T. Kurtz, *Recombinant DNA: A Short Course*. Copyright © 1983 de W. H. Freeman and Company.)

resis). La electroforesis es una técnica general que permite separar ácidos nucleicos o proteínas de acuerdo con su tamaño cuando se depositan en geles sometidos a un campo eléctrico intenso. Mediante este procedimiento se separan los fragmentos de DNA más cortos. La PFGE es un tipo especializado de electroforesis que permite la separación de moléculas de DNA muy largas. Se sirve de varios campos eléctricos oscilantes que están orientados en varias direcciones. Esto permite que moléculas de DNA de gran tamaño migren a posiciones diferentes del gel según su tamaño. El cromosoma de interés puede identificarse utilizando una sonda específica de dicho cromosoma (véase el siguiente subapartado). Una vez identificado, se corta la banda del gel que contiene el cromosoma deseado, se eluye del gel y se utiliza para construir una genoteca específica de un cromosoma.

¿Cómo puede determinar el investigador si una genoteca es suficientemente amplia para contener una secuencia única de interés con un grado razonable de certeza? Existen fórmulas que permiten calcular el número mínimo de clones necesarios, aunque puede obtenerse una idea aproximada de la magnitud exigida para una genoteca simplemente considerando el tamaño total del genoma y dividiéndolo por el tamaño medio de los insertos transportados por el vector. Generalmente, el número real será por lo menos el doble, pero proporciona una estima de la magnitud del trabajo a invertir en la construcción de una genoteca.

COROLARIO

La tarea de aislar un clon que contenga un gen concreto comienza con la construcción de una genoteca de DNA genómico o de cDNA —si es posible, enriquecida en secuencias que contengan el gen en cuestión—.

Identificación de clones específicos mediante la utilización de sondas

La genoteca, que podría contener tanto como cientos de miles de fragmentos clonados, debe examinarse para encontrar la molécula de DNA recombinante que contenga el gen de interés. Este escrutinio se realiza mediante la utilización de una **sonda** específica que reconocerá específicamente el clon, permitiendo así que el investigador lo detecte. En términos amplios, existen dos tipos de sondas: las que reconocen DNA y las que reconocen proteína.

Sondas para la detección de DNA. El uso de estas sondas se basa en la tendencia natural a la complementariedad entre cadenas sencillas de ácidos nucleicos. Así, una sonda de DNA que haya sido desnaturalizada (cuyas dos cadenas se hayan separado) encontrará y se unirá a otras secuencias de la genoteca similares que hayan sido desnaturalizadas.

Sonda

3'-AAGCCTATTTATGGGCAAT-5'

Clon

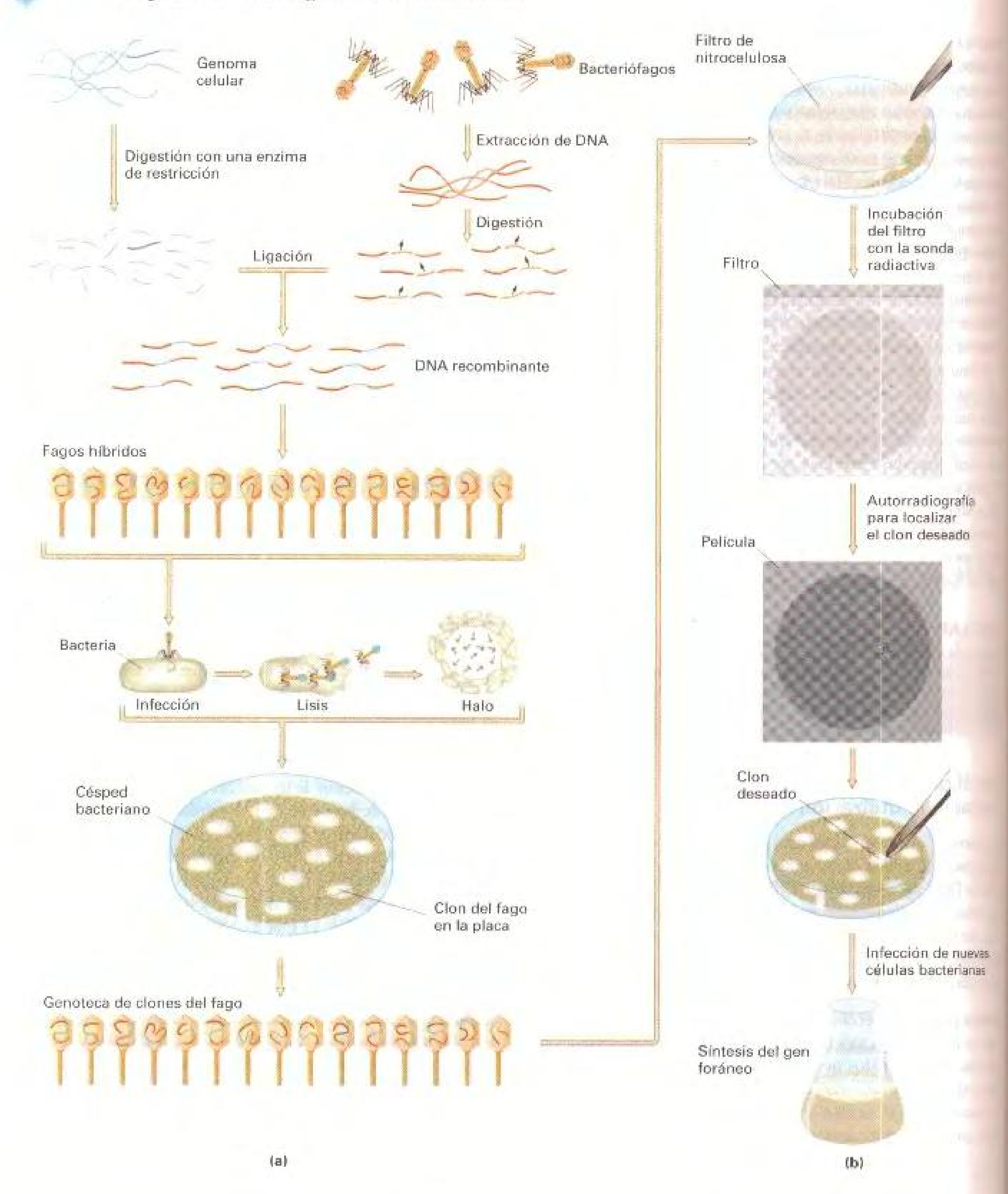
5'...AGCTAGGGATCTTCGGATAAATACCCGTTACGTACTATTGGAAGGA...-3'

La identificación de un clon específico de una genoteca consta de dos pasos (Fig. 12-10). Primero, colonias o halos de la genoteca situados en una placa de Petri se transfieren a una membrana absorbente (en general, nitrocelulosa), simplemente depositando la membrana sobre la superficie del medio. A continuación, se levanta la membrana, y las colonias o halos que se hayan adherido a la superficie se lisan *in situ* y se desnaturaliza el DNA. El siguiente paso consiste en sumergir la membrana en una solución con una sonda específica para el DNA de interés. La sonda debe estar marcada con radiactividad o con un compuesto fluorescente. En general, la propia sonda es un fragmento de DNA clonado que contiene una secuencia homóloga al gen deseado. La sonda de DNA debe desnaturalizarse, para que se una exclusivamente al DNA del clon que se persigue. La posición del clon positivo será revelada por la posición de la sonda concentrada, a menudo una mancha en un autorradiograma.

¿De dónde procede el DNA que se utiliza para obtener una sonda? Puede tener diversos orígenes. Una posibilidad es que sea cDNA obtenido de un tejido que exprese el gen de interés. La idea es que, debido a que el mRNA de un gen abundará en ese tejido, es muy probable que muchos de los cDNA sintetizados a partir de ese tejido e insertados individualmente en las moléculas de vector correspondan al gen deseado. Por ejemplo, en reticulocitos de mamíferos, el 90 % del mRNA procede de la transcripción del gen de la β-globina, por lo que los reticulocitos serán una fuente adecuada de mRNA para sintetizar una sonda de cDNA que permita «cazar» el gen genómico de la globina. En este caso, habría que rastrear una genoteca genómica. La elección depende del tipo de preguntas que nos interese resolver acerca del gen. Si sólo estamos interesados en la región que se transcribe, un clon de cDNA será tan informativo como uno genómico. Si, por el contrario, estamos interesados en el gen completo, con sus intrones y secuencias reguladoras, entonces es necesario que busquemos un clon genómico.

Otra fuente de DNA para la obtención de una sonda puede ser un gen homólogo de un organismo relacionado. Por ejemplo, si disponemos de un clon de un gen del hongo ascomiceto *Neurospora*, es bastante probable que se pueda utilizar este gen como sonda para encontrar el gen homólogo en el hongo relacionado *Podospora*. La eficacia de este método depende del grado de conservación evolutiva de las secuencias de DNA. Aun cuando las secuencias de DNA de la sonda y del gen de interés puede que no sean idénticas, el grado de similitud suele ser suficiente para permitir la hibridación. En tono jocoso, solemos referirnos a este método con la expresión «clonación por teléfono» porque, si telefoneas a un colega que haya obtenido un clon del gen de interés a partir de un organismo relacionado, la tarea de clonación suele convertirse en un proceso relativamente fácil.

También puede sintetizarse una sonda de DNA cuando se conoce el producto proteico del gen de interés y su secuencia de aminoácidos. Se diseñan oligonucleótidos sintéticos teniendo en cuenta el código genético, de modo que bastaría con traducir en sentido inverso la secuencia de aminoácidos para deducir la secuencia de nucleótidos correspondiente. Sin embargo, debido a la redundancia del código —en otras palabras, a que la mayoría de los aminoácidos están determinados por más de un codón— hay más de una secuencia de DNA posible que podría determinar la proteína en cuestión. Para subsanar este problema, se elige un tramo de aminoácidos corto y con una redundancia mínima. Utilizando el diccionario de codones se deducen las posibles secuencias. La síntesis química de oligonucleótidos es un proceso



que se realiza paso a paso; esto permite la síntesis simultánea de todas las secuencias posibles mediante el suministro de una mezcla de los nucleótidos alternativos en aquellos pasos que correspondan a posiciones de la secuencia donde existe ambigüedad. La Figura 12-11 contempla un ejemplo con cinco posiciones que presentan redundancia: 2, 3, 2, 2 y 2 alternativas, respectivamente. La reacción sintetizaría 2 × 3 × 2 × 2 × 2 = 48 **oligonucleótidos** simultáneamente. Esta mezcla de oligonucleótidos se utilizaría como sonda y la cadena con la secuencia correcta nos permitiría detectar el gen de interés. Veinte nucleótidos con-

Figura 12-10. (a) Se puede construir una genoteca genómica mediante la clonación de genes en el bacteriófago λ. Cuando se infecta un césped bacteriano con un número elevado de fagos híbridos diferentes, cada uno de los halos del césped corresponde a un único clon de fagos descendiente del fago que infectó originalmente. Cada clon contiene un fragmento diferente de DNA celular. El problema ahora consiste en identificar qué clon contiene un determinado gen de interés (azul oscuro) mediante la utilización de sondas de DNA o RNA relacionadas con el gen deseado. (b) Se hace una réplica de los halos sobre un filtro de nitrocelulosa, y se degradan la proteínas virales, dejando sólo el DNA recombinante, que se desnaturaliza para facilitar su adsorción al filtro. El filtro se incuba con una sonda marcada radiactivamente, es decir, con una copia en DNA del mRNA correspondiente al gen de interés. La sonda hibridará con cualquier DNA recombinante que haya incorporado su secuencia complementaria; la posición del clon positivo se detecta por autorradiografía. Los clones de interés pueden seleccionarse del medio de cultivo y transferirse de nuevo a una célula bacteriana, para obtener un gen en estado puro. (Tomado de R. A. Weinberg, «A Molecular Basis of Cancer.» y P. Leder, «The Genetics of Antibody Diversity.» Copyright © 1983, 1982 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

...cieren la especificidad necesaria para la identificación de una secuencia única de DNA a partir de una genoteca.

Además, también puede utilizarse RNA marcado radiactivamente como sonda. Esta posibilidad existe cuando se dispone de una población relativamente pura de moléculas idénticas de RNA, tales como rRNA o tRNA en distintas fracciones.

Sondas para la detección de proteínas. Si se conoce el producto proteico de un gen y se purifica a homogeneidad, la proteína puede utilizarse para detectar el clon del gen correspondiente en una genoteca. El proceso se describe en la Figura 12-12. Se obtiene un anticuerpo que reconozca específicamente la proteína y se utiliza para rastrear una genoteca de expresión. Este tipo de genotecas se contruye utilizando vectores de expresión que permitan niveles elevados de expresión de una determinada proteína bacteriana. Para construir la genoteca, los cDNA se insertan en el vector de manera que su fase de traducción coincida con la de la proteína bacteriana y las células sinteticen proteínas de



Figura 12-11. Se utiliza una secuencia corta de una proteína para diseñar un conjunto de oligonucleótidos redundantes para su uso como sonda en la búsqueda del gen que determina esa proteína. Una de las sondas que componen el conjunto coincidirá con la secuencia del gen. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)

fusión. Se deposita una membrana sobre la superficie del medio para obtener una réplica de las colonias, se seca y se sumerge en una solución con el anticuerpo. Los clones positivos se detectan utilizando un anticuerpo secundario, que reconoce al primer anticuerpo y está marcado con un isótopo radiactivo, un compuesto fluorescente o un compuesto coloreado. Al detectar la proteína correcta, el anticuerpo desvela el clon portador del gen que determina la síntesis de dicha proteína.

Al principio del capítulo, se planteó la cuestión de cómo podría identificarse el gen responsable del albinismo en el hombre. Pues se clonó precisamente utilizando un anticuerpo que reconoce la enzima tirosinasa, cuya deficiencia es la que provoca este trastorno. En primer lugar, se purificó la enzima, como cualquier otra proteína, utilizando métodos bioquímicos establecidos. Una vez purificada, se obtuvieron anticuerpos específicos de conejo. Se aisló el mRNA total a partir de células productoras de tirosinasa y se utilizó para sintetizar cDNA. Con el cDNA se construyó una genoteca de expresión. Se rastreó la genoteca con el anticuerpo anti-tirosinasa y se obtuvieron varios clones positivos. Tras secuenciar el cDNA de los clones positivos, se identificó un gen cuyos exones sumaban 1590 pares de bases. Este cDNA se utilizó para rastrear una genoteca genómica humana y, en este proceso, se identificó el gen de la tirosinasa, con cinco exones y cuatro intrones.

COROLARIO

Se puede identificar un clon concreto de una genoteca utilizando una sonda específica que detecte el gen de interés o el producto proteico de este gen.

Identificación de clones específicos mediante complementación funcional

También pueden identificarse clones específicos de una genoteca construida en bacterias o en fagos haciendo uso de su capacidad para complementar el fenotipo de una línea mutante del organismo donante transformada con la genoteca. Este procedimiento se denomina **complementación funcional** y el protocolo a seguir sería:

Construcción de una genoteca en bacterias o en fagos utilizando DNA silvestre como donante

↓

Transformación de una línea mutante a^- con la genoteca

↓

Selección del fenotipo a^+ entre las células del organismo donante

↓

Recuperación del gen a^+ a partir del clon bacteriano o viral adecuado o de las células donantes transformadas

Este método exige que el organismo donante, con frecuencia un eucariota, sea susceptible de ser transformado. En un capítulo previo se trató la transformación en procariotas (Cap. 7), pero los eucariotas también pueden ser objeto de transformación. Aunque hay diferencias entre el procedimiento que se utiliza con diferentes eucariotas, es habitual que haya que someter a las cé-

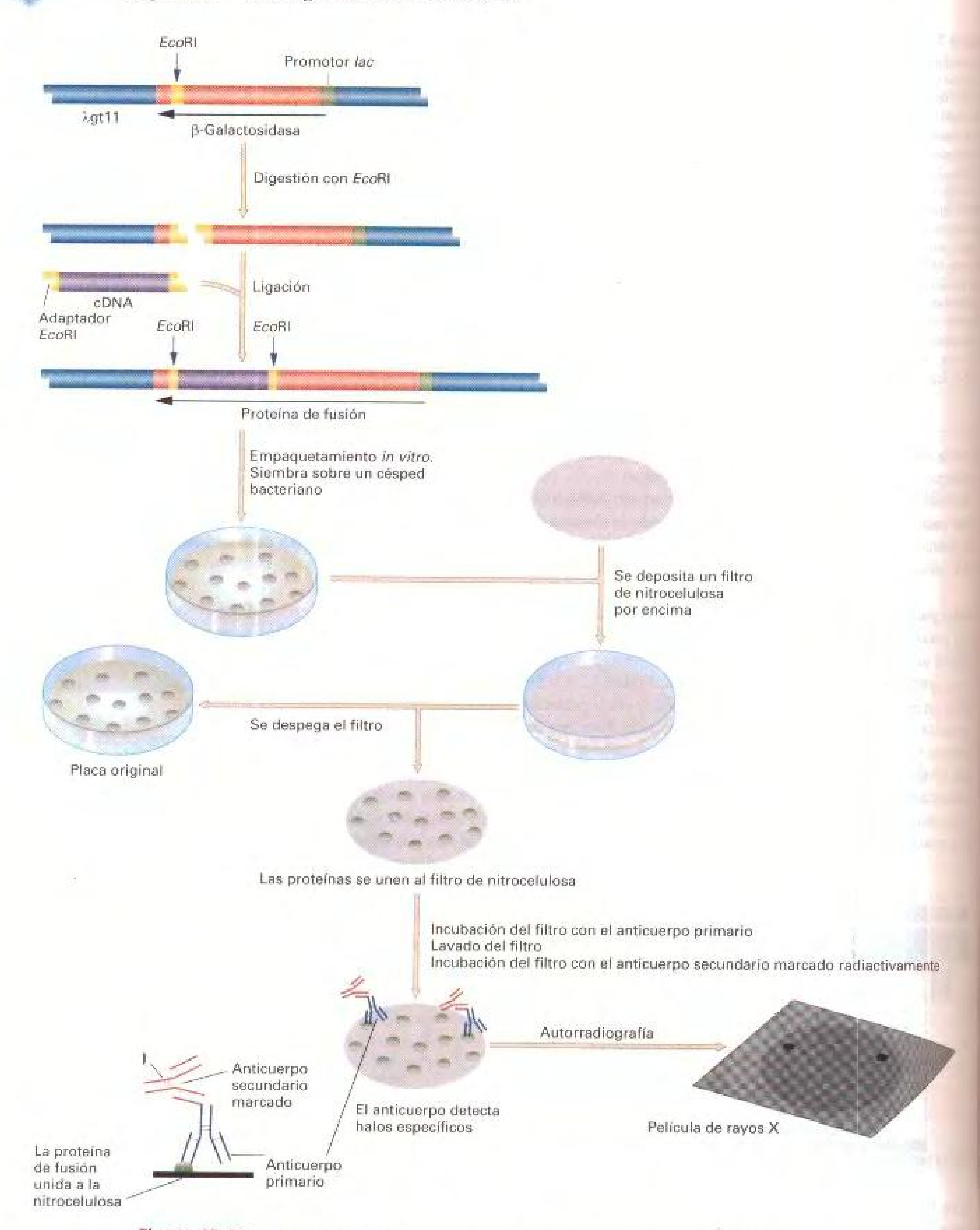


Figura 12-12. Búsqueda del clon de interés mediante el uso de anticuerpos. Una genoteca de expresión construida en el fago derivado λgt11 se analiza con un anticuerpo. Después de eliminar del filtro los anticuerpos que no se hayan unido, los anticuerpos retenidos se detectan mediante la unión de un anticuerpo secundario radiactivo. (Tomado de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de Scientific American Books.)

lulas recipientes a un tratamiento especial. Por ejemplo, para transformar hongos, suele ser necesaria la eliminación enzimática de las paredes celulares. Supongamos que hemos aislado un mutante relacionado con algún proceso de interés para nosotros, por ejemplo, un mutante auxótrofo de un hongo. Utilizaríamos el DNA de la genoteca para transformar la estirpe auxótrofa y luego sembraríamos las células recipientes en medio mínimo. Las células que hayan incorporado el alelo silvestre (procedente del cultivo silvestre que se utilizó para construir la genoteca) habrán dejado de ser auxótrofas y crecerán en medio mínimo.

La explicación para que este método de transformación funcione consiste en que el fragmento transformante complementa funcionalmente la deficiencia provocada por el alelo mutante en la estirpe recipiente. A simple vista podría parecer que este concepto de complementación difiere del desarrollado en el Capítulo 4; es decir, la producción de un fenotipo silvestre cuando se combinan dos genomas mutantes. Sin embargo, el vector transformante aporta algo de lo que carece el genoma recipiente (el alelo silvestre que se persigue), y el genoma recipiente aporta algo de lo que carece el vector (el resto del genoma), de modo que sí que podemos hablar de un tipo de complementación.

Si el recipiente de la transformación es un organismo en el que los vectores plasmídicos se replican autónomamente (principalmente bacterias y levaduras), entonces el inserto transformante puede recuperarse simplemente por aislamiento del plásmido. Sin embargo, como veremos, en la mayoría de los organismos el vector no se replica y es necesario que se inserte en el genoma para conseguir una transformación estable. En estos casos, el fragmento transformante es relativamente inaccesible y su recuperación debe realizarse a partir del clon de la genoteca que dé un resultado positivo. Para ello, se utiliza una genoteca en la que los clones están numerados y dispuestos en forma de una colección de cultivos bacterianos en tubos o cajas con múltiples pocillos. Se aísla DNA en masa a partir de todas las estirpes agrupadas en un subconjunto determinado de la genoteca y con este DNA se transforma. El proceso consiste en ir

GENOTECA DE CÓSMIDOS

3072 clones distribuidos en 32 grupos de 96

El mutante *trp3* se transforma con los 32 grupos
Se obtiene un grupo positivo tras seleccionar *trp3*+

96 en 12 grupos de 8

Se transforma con los 12 grupos
y se obtiene un positivo

8 clones individuales

Transformación

Presunto clon
con *trp3*+

Figura 12-13. Localización de un gen clonado mediante la utilización de muestras de DNA progresivamente menos complejas. En el ejemplo, la búsqueda se lleva a cabo para el gen *trp3* de *Neurospora* (Tomado de J. R. S. Fincham, *Genetic Analysis*. Copyright © 1995 de Blackwell.)

reduciendo el tamaño de los subconjuntos de la genoteca que complementan hasta identificar el clon portador del alelo silvestre. La Figura 12-13 ilustra el proceso utilizando como ejemplo el gen *trp3* de *Neurospora*, que mencionamos al principio del capítulo. En este caso se utilizó una genoteca de cósmidos. Los cósmidos contienen un gen marcador que permite seleccionar los transformantes del hongo. El gen de resistencia a higromicina es un marcador habitual cuando se trabaja con hongos, ya que estos organismos suelen ser sensibles a este compuesto. Se transformaron células mutantes *trp3* con diferentes subconjuntos de una genoteca construida a partir de DNA silvestre de *Neurospora*, y se seleccionaron los clones *trp3*$^+$ sembrando las células transformadas en medio con higromicina pero sin triptófano. Las colonias que crecieron contenían probablemente el alelo *trp3*$^-$, y se aislaron de la placa de Petri.

En la mayoría de los casos, el vector portador del alelo silvestre se inserta en los cromosomas de la célula recipiente en una posición diferente a la del locus mutante, dando lugar a una integración **ectópica** (Fig. 12-14). Es menos habitual que el alelo silvestre transformante sustituya al alelo mutante mediante su integración por un doble hecho de entrecruzamiento.

Cuando se clona un gen eucariótico en un vector procariótico y se conoce una secuencia eucariótica específica que funciona como origen de replicación, puede resultar conveniente añadir esta secuencia al vector. Así podrá replicarse tanto en células bacterianas como eucarióticas, y la inserción en el cromosoma no será esencial. Estos vectores se denominan *vectores transbordadores*, porque pueden movilizarse repetidamente de un organismo a otro. Cuando no va asociado a un origen de replicación, el DNA donante *debe* integrarse en el cromosoma eucariótico para que ocurra una transformación estable.

COROLARIO

Una manera de identificar genes específicos clonados consiste en utilizar su DNA para transformar células recipientes del organismo donante portadoras de alelos nulos y complementar el fenotipo mutante.

Clonación posicional

La información posicional de un gen permite evitar la ardua tarea de analizar una genoteca completa en busca de un clon de interés. El término **clonación posicional** puede aplicarse a cualquier método que haga uso de esta información. Con frecuencia, el análisis por hibridación con sondas y la complementación forman parte de la clonación posicional. Un punto de partida habitual es otro gen clonado u otro marcador que se encuentre estrechamente ligado al gen de interés. El marcador ligado sirve de punto de referencia para iniciar un proceso denominado **paseo cromosómico**, que nos guiará hasta el gen diana. La Figura 12-15 resume el procedimiento. Los extremos de un clon portador del marcador ligado se utilizan como sondas para identificar otros clones de la genoteca. Estas sondas detectarán clones correspondientes a regiones contiguas que solapen parcialmente con el clon inicial. Se elaboran mapas de restricción del DNA de estos segundos clones y, de nuevo, los extremos se utilizan para una

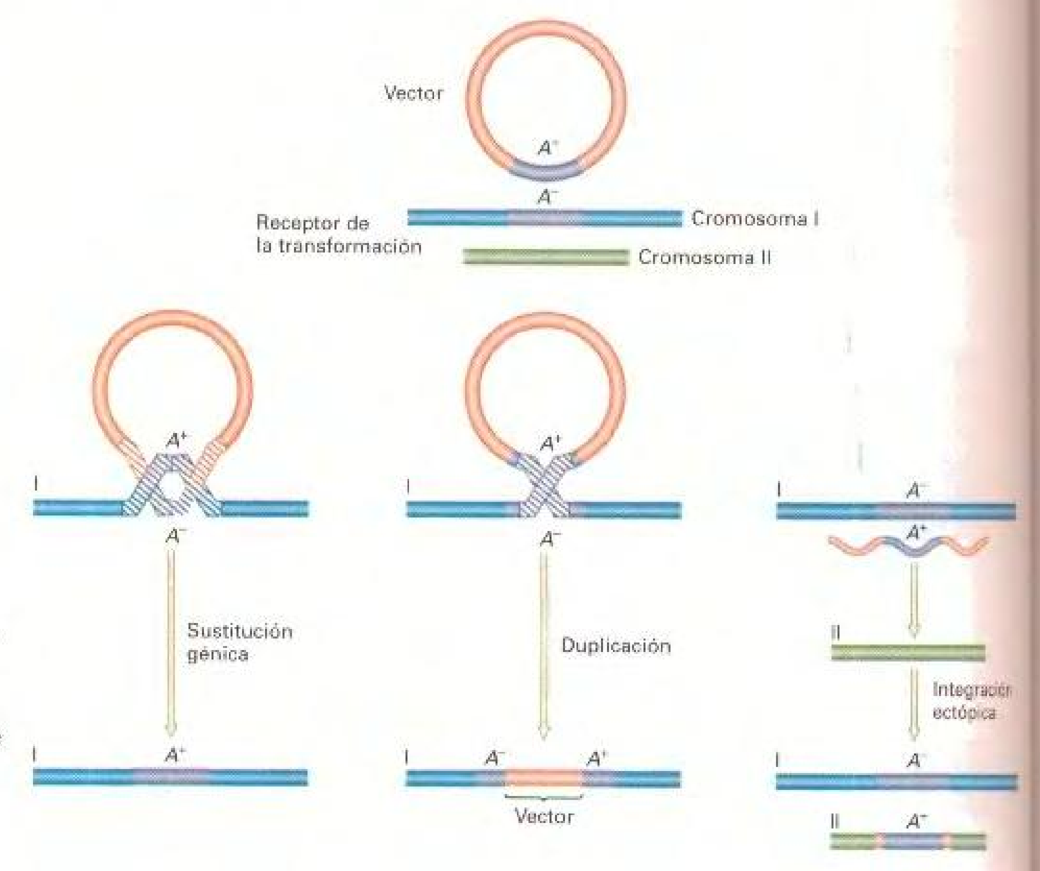


Figura 12-14. Posibles destinos del DNA transformante. Un alelo donante silvestre A^+ (clonado en un vector bacteriano) transforma una célula recipiente A^- mediante uno de tres tipos posibles de inserción. **Nota:** el DNA receptor suele ser de la misma especie que el donante, ya sea procariótico o eucariótico. Se muestran dos cromosomas receptores, I y II.

80 kb

A a B b C c D d E e DNA eucariótico

Digestión con EcoRI; inserción entre los brazos de λ

Brazos de λ

Escrutinio con la sonda específica del gen *A*

Genoteca de λ

14 kb

Clon 1 de λ

Subclonación de un fragmento pequeño

Nuevo escrutinio de la genoteca

Clon adyacente 2

Subclonación de un fragmento pequeño, etc.

Clones de λ solapados generados por digestión parcial

Figura 12-15. Paseo cromosómico. Un fago recombinante obtenido a partir de una genoteca construida mediante digestión parcial con *Eco*RI de un genoma eucariótico puede utilizarse para aislar otro fago recombinante que contenga un segmento adyacente del DNA eucariótico, como se describe en el texto. (Tomado de J. D. Watson, J. Tooze y D. T. Kurtz, *Recombinant DNA: A Short Course*. Copyright © 1983 de W. H. Freeman and Company).

nueva ronda de escrutinio de la genoteca en busca de fragmentos contiguos con un cierto grado de solapamiento. De este modo, se pasea en ambas direcciones a partir del punto de partida. Cada clon se secuencia o se analiza, dependiendo del objetivo de la búsqueda.

En ocasiones, un inserto suficientemente grande que contenga el marcador ligado puede que, por fortuna, también incluya el gen de interés; mediante subclonación y transformación es posible identificar la región adecuada del cósmido. Un número elevado de marcadores de DNA neutros (polimorfismos de los fragmentos de restricción) que se encuentran dispersos a lo largo de la mayoría de los genomas han sido de gran utilidad como puntos de partida para la clonación de genes por este método. La clonación posicional ha sido muy ventajosa para la clonación de genes humanos, muchos de los cuales carecen de una función bioquímica conocida y, por ello, no son fáciles de detectar por complementación funcional. El gen humano causante de la fibrosis quística, ya mencionado al principio del capítulo, se clonó por paseo cromosómico. En el Capítulo 14, examinaremos con más detalle los pormenores de su clonación. Para el paseo cromosómico debe aplicarse algún tipo de criterio que permita evaluar el éxito de cada etapa del paseo en busca del gen de interés; estos criterios dependen del gen concreto que se persiga.

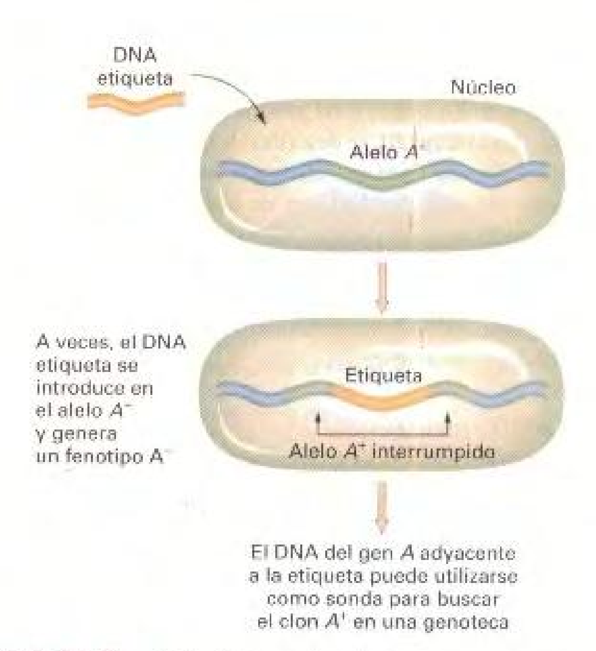


Figura 12-16. Utilización de una inserción de DNA como etiqueta para marcar y aislar un gen del genoma. La etiqueta de DNA puede ser DNA transformante o un transposón endógeno (elemento móvil).

Clonación mediante la utilización de etiquetas

La clonación mediante la utilización de etiquetas es un método que permite la identificación directa de un gen mediante la inducción de mutaciones en el mismo por inserción de fragmentos de DNA específicos. Estas secuencias incorporan una «etiqueta» en el gen, que puede utilizarse como sonda para aislarlo. La Figura 12-16 resume esta estrategia. Un tipo de etiqueta sería un DNA transformante concreto. Cuando se añade DNA exógeno por transformación o por otros métodos tales como la inyección, éste puede integrarse en el genoma y convertirse en parte del cromosoma. La integración ectópica ocurre al azar por todo el genoma; parece que no existen segmentos cromosómicos que sean inmunes a la integración. Cuando la integración ocurre dentro o cerca de un gen, el fragmento integrante actúa como un mutágeno, eliminando la función del gen. Esta propiedad puede utilizarse para clonarlo. Suponga que utilizamos un alelo x^+ específico para transformar células x^- del organismo donante en x^+. Muchos de los transformantes x^+ serán mutantes para los genes en los que el DNA transformante se ha insertado ectópicamente. Algunas de las células x^+ serán mutantes para el gen de interés *a*, y serán de fenotipo a^-. Es necesario entonces que identifiquemos las células a^- de entre todos los transformantes x^+. El siguiente paso consiste en cruzar los transformantes para determinar si el fenotipo a^- segrega con el x^+. Si es así, es muy probable que la mutación se haya originado por la integración del fragmento portador del alelo x^+. Con el DNA de esta línea mutante se construye una genoteca que se analiza con el alelo x^+ para identificar el clon portador del gen *a* interrumpido. Para recuperar el gen *a* silvestre, se realiza una segunda ronda de escrutinio, en esta ocasión de una genoteca silvestre, utilizando como sonda un segmento del gen *a* interrumpido.

Siguiendo una estrategia similar, los genes pueden marcarse con transposones. Los transposones son fragmentos de DNA móviles que se encuentran en muchos organismos. Cuando se movilizan, pueden insertarse en cualquier parte del genoma. Si se insertan dentro o cerca de un gen, pueden provocar una mutación nula. (En el Cap. 20, se describen los transposones con mayor detalle). En una línea que contenga un transposón activo, se seleccionan mutantes para el gen de interés. Muchos de estos mutantes surgirán por inserción del transposón. Tras construir una genoteca a partir de una de estas líneas mutantes, puede utilizarse un segmento del transposón como sonda para recuperar el gen, siguiendo un procedimiento similar al ilustrado en la Figura 12-16.

COROLARIO

La mutagénesis de un gen por inserción de DNA transformante, o de un transposón, coloca una etiqueta en el gen de interés que facilita su aislamiento.

Aplicaciones del DNA clonado

El DNA clonado tiene diversas aplicaciones que vienen dictadas por las necesidades del experimento. En este apartado, consideraremos algunas aplicaciones básicas que tienen utilidad en una amplia gama de circunstancias experimentales.

El DNA clonado como sonda

Ya hemos abordado varios ejemplos de este tipo de aplicación, como el uso de un gen clonado a partir de un organismo para identificar el clon correspondiente en otro organismo. A continuación, analizaremos ejemplos adicionales.

Utilización como sonda para identificar un ácido nucleico específico en una mezcla

En el curso de la manipulación de genes y genomas, es probable que tengamos que detectar y aislar moléculas específicas de DNA que se encuentran formando parte de una mezcla. Por ejemplo, recuerde que cuando se utiliza el fago λ como vector de clonación es necesario separar los dos brazos cromosómicos de la región central no deseada. Aunque existen varias métodos para fraccionar el DNA, el que se utiliza más frecuentemente es la electroforesis (véase el esquema de un aparato electroforético en la Fig. 4-5). Si se deposita una mezcla de moléculas lineales de DNA en el pocillo de un gel de agarosa y el pocillo se coloca

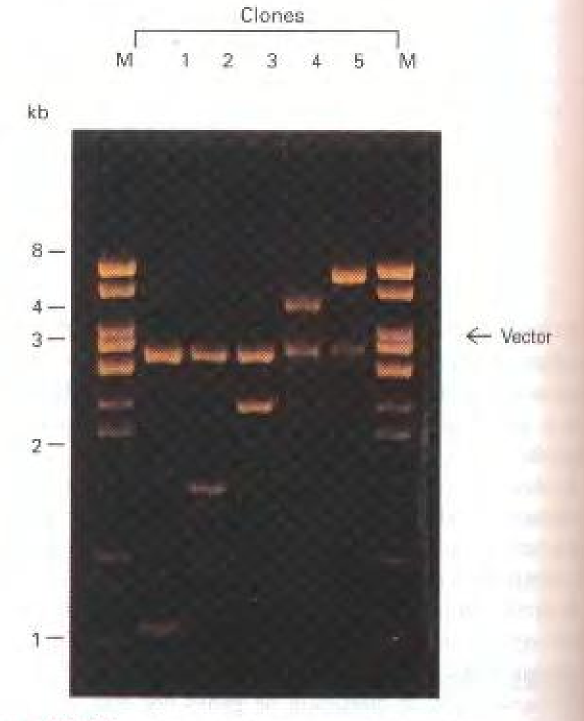
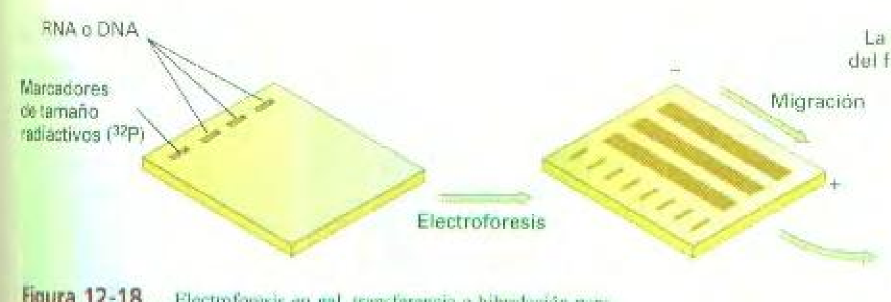


Figura 12-17. Mezclas de fragmentos de DNA de diferentes tamaños separados por electroforesis en un gel de agarosa. En este caso, las muestras son cinco vectores recombinantes tratados con *Eco*RI. Las mezclas se depositan en pocillos situados en la parte superior del gel, y los fragmentos se mueven bajo la influencia de un campo eléctrico a posiciones diferentes dependiendo del tamaño (y, por lo tanto, del número de cargas). Las bandas de DNA se han visualizado mediante tinción con bromuro de etidio e iluminación del gel con luz ultravioleta. (Los carriles marcados con M contienen marcadores de tamaño para estimar la longitud de los fragmentos). (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.).



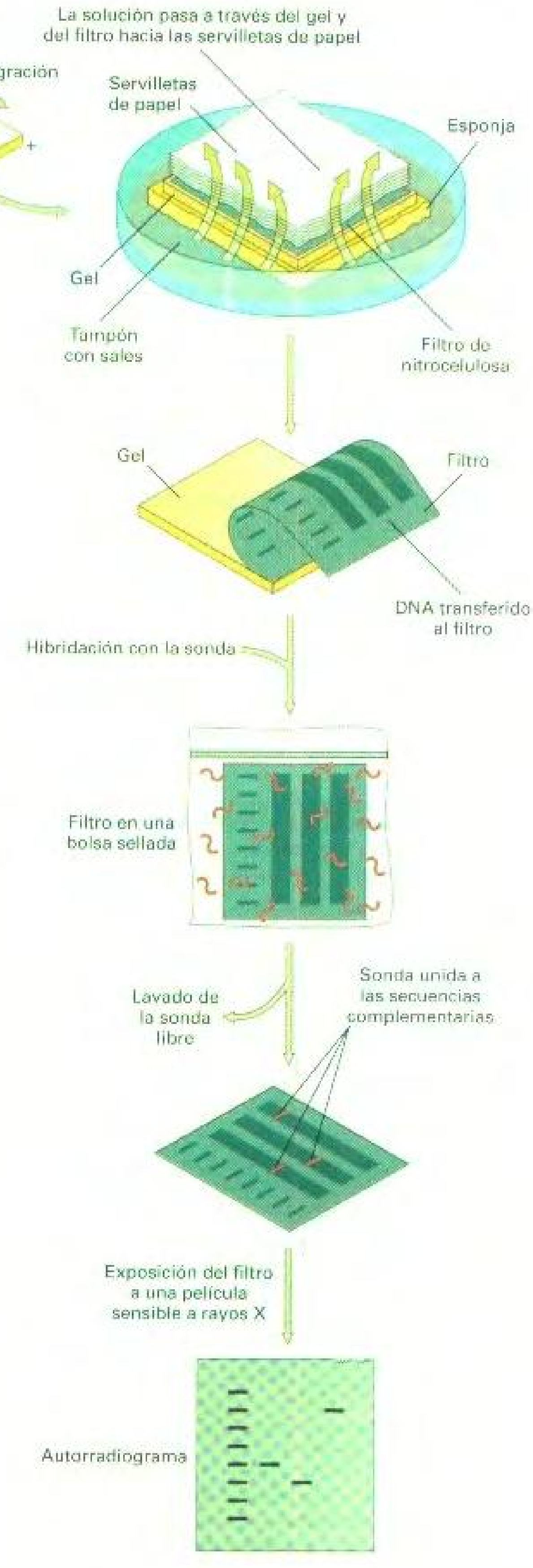


Figura 12-18. Electroforesis en gel, transferencia e hibridación para identificar genes clonados concretos. Se carga RNA o fragmentos de restricción de DNA en un gel de agarosa y se someten a electroforesis. Los diferentes fragmentos migran a posiciones diferentes según su tamaño. Se coloca el gel en tampón, y se cubre con un filtro de nitrocelulosa y una pila de servilletas de papel (papel secante). Los fragmentos se desnaturalizan para que puedan adherirse a la nitrocelulosa cuando son arrastrados hasta el filtro por el tampón, que se mueve por capilaridad hacia el papel secante. A continuación, el filtro se despega y se incuba con una sonda de cadena sencilla marcada radiactivamente, que es complementaria a la secuencia diana. Tras eliminar la sonda que no haya hibridado por lavado, el filtro se expone a una película sensible a los rayos X. Dado que la sonda radiactiva habrá hibridado sólo con los fragmentos de restricción complementarios, la película se impresionará únicamente en las posiciones que correspondan a esos fragmentos. Por comparación con las posiciones de marcadores de tamaño radiactivos, se estima el tamaño de los fragmentos que contienen las secuencias diana. Esta información puede utilizarse para situar las secuencias en los mapas de restricción. El procedimiento se denomina *técnica de Southern* cuando lo que se transfiere es DNA, y *técnica de Northern* cuando es RNA. (Tomado de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de Scientific American Books.)

cerca del cátodo de un campo eléctrico, las moléculas se moverán a través del gel hacia el ánodo, a una velocidad que depende de su tamaño (Fig. 12-17). Si la mezcla está compuesta de moléculas de diferente tamaño, estas moléculas se separarán en el gel, dando lugar a bandas definidas. Las bandas se visualizan tiñendo el DNA con bromuro de etidio, que hace que el DNA emita fluorescencia cuando se irradia con luz ultravioleta. Si las bandas están bien separadas, se puede cortar una banda individual del gel y luego purificar el DNA de la agarosa. Por lo tanto, la electroforesis de DNA puede utilizarse con fines diagnósticos (para determinar los fragmentos presentes en una muestra) o preparativos (para aislar fragmentos específicos).

La digestión de DNA genómico con enzimas de restricción genera tantos fragmentos que cuando se someten a electroforesis en gel aparecen como una mancha amplia y difusa de DNA. Utilizando una sonda podemos identificar un fragmento específico de la mezcla, mediante la técnica desarrollada por E. M. Southern y conocida como **técnica de Southern**. Después de la separación de los fragmentos de DNA, se deposita una membrana absorbente sobre el gel y se transfieren las bandas de DNA a la membrana por capilaridad. Una vez transferidas a la membrana, las bandas de DNA ocupan las mismas posiciones relativas que en el gel. La membrana se sumerge en una solución con una sonda marcada, y luego se expone a una película sensible a rayos X para revelar la presencia de bandas en el gel que sean homólogas a la sonda. Si procede, las bandas pueden cortarse del gel y ser procesadas adecuadamente. El tamaño de las bandas en el gel puede calibrarse corriendo en el mismo gel una mezcla de fragmentos de tamaño conocido. De este modo podemos inferir el

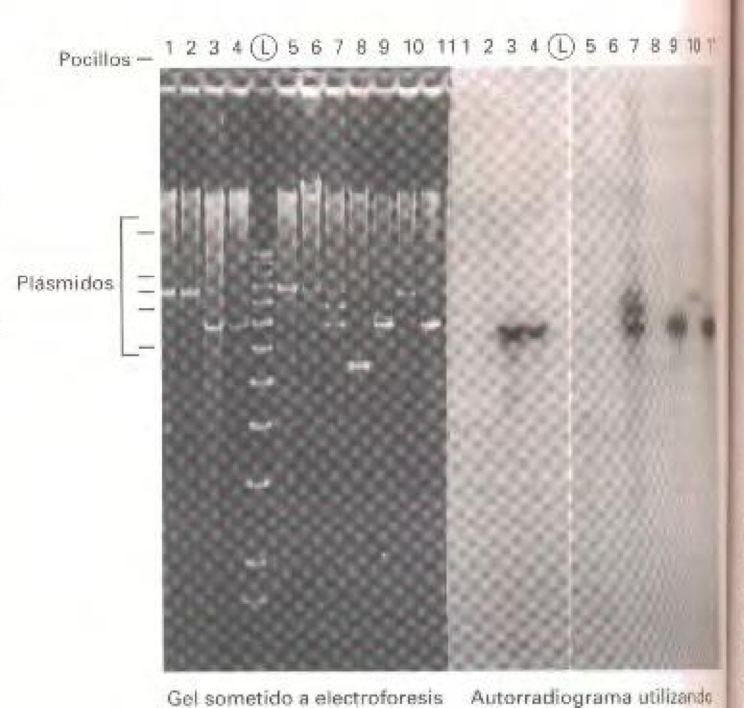
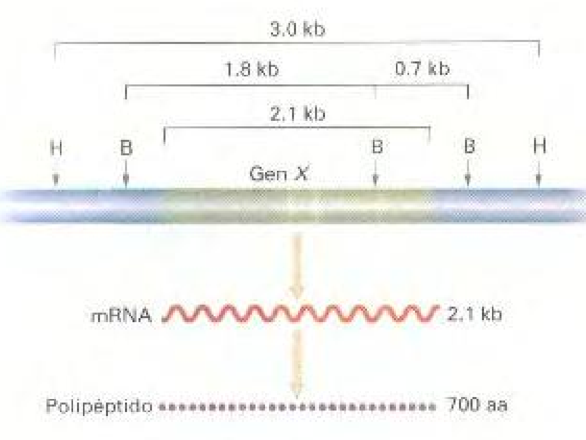


Figura 12-19. Ejemplo de análisis mediante la técnica de Southern. El DNA mitocondrial de 11 estirpes de *Neurospora* con una localización geográfica diferente se ha sometido a electroforesis, y el gel se ha teñido con bromuro de etidio. Las bandas brillantes son plásmidos lineales; algunas de las posiciones de estos plásmidos están marcadas. El carril marcado como L contiene una «escalera» de fragmentos de DNA de tamaños conocidos. Los tamaños de los «peldaños» visibles en esta figura son (de abajo a arriba) 1.5 kb, 2 kb, y luego una kilobase adicional por cada peldaño, hasta 12 kb. El plásmido de la estirpe 11 se clonó y se utilizó como sonda para el análisis por la técnica de Southern. El autorradiograma revela que varios de los otros plásmidos contienen secuencias homólogas a las del plásmido 11. De hecho, la estirpe 7 contiene una familia de tres plásmidos, todos homólogos al de la estirpe 11. (De Simon Yang.)



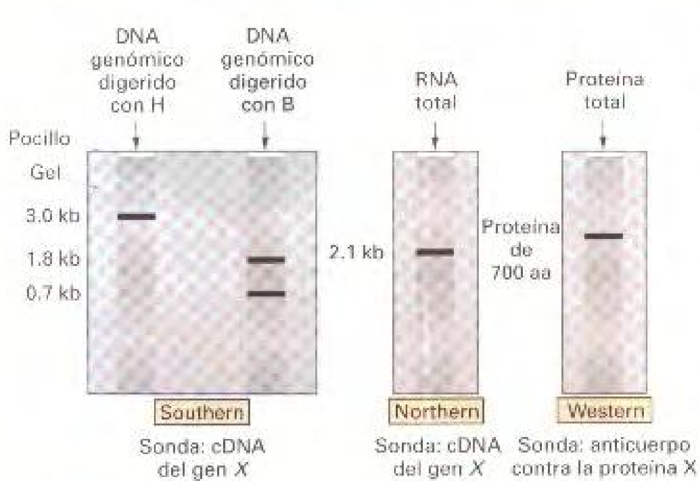


Figura 12-20. Comparación de los análisis del gen *X* mediante las técnicas de Southern, Northern y Western. B y H representan sitios diana para las enzimas de restricción B y H. (**Nota:** las posiciones de las bandas en el análisis mediante la técnica de Southern no son comparables con las posiciones de las bandas en los otros dos tipos de análisis.)

tamaño de cualquier fragmento de interés en nuestra muest experimental. La Figura 12-18 ilustra el proceso general d transferencia por la técnica de Southern. La Figura 12-19 mues tra una aplicación en la que un fragmento clonado a partir de u plásmido típico de hongos se utilizó para identificar plásmid homólogos en una diversidad de estirpes.

La técnica de Southern puede hacerse extensiva a la detecci de una molécula de *RNA* específica que se haya separado d otras moléculas de RNA por fraccionamiento en gel. En es caso se denomina **técnica Northern**, para distinguirla de la té nica desarrollada por Southern para el análisis de *DNA*. El RN fraccionado se transfiere a una membrana y se somete al mism tratamiento de detección descrito para la técnica de Southern Una aplicación de la técnica Northern consiste en la determin ción de la expresión de un gen en un tejido determinado e unas condiciones ambientales determinadas. Primero, se ext RNA de la muestra celular apropiada, y luego se somete a ele troforesis, transferencia e hibridación con una sonda específ del gen de interés. Una señal positiva indica la presencia d transcrito en cuestión.

Hemos visto que un DNA clonado presta un amplio servi como sonda, ya sea para detectar un clon determinado, un fra mento de DNA concreto o un RNA específico. En todos es casos, se hace uso de la capacidad de los ácidos nucleicos p encontrar sus secuencias complementarias y unirse a ellas e solución.

Se ha desarrollado una técnica paralela denominada técni **Western**, que consiste en la transferencia electroforética de p *teínas* fraccionadas en un gel y la visualización de proteínas c cretas mediante el uso de anticuerpos. Sin embargo, adviert la sonda, en esta ocasión, no es un fragmento de DNA sin

anticuerpo marcado. Estas tres técnicas son herramientas moleculares fundamentales en la detección y clasificación de macromoléculas. En la Figura 12-20 se comparan las tres técnicas.

COROLARIO

DNA o RNA que haya sido fraccionado según su tamaño por electroforesis en gel puede transferirse a una membrana absorbente, en la que puede detectarse la posición de fragmentos específicos mediante el uso de sondas.

Determinación de la secuencia de DNA

La clonación de un gen de interés no es más que el principio de una segunda ronda de análisis cuyo objetivo es la caracterización de la estructura y función de dicho gen. La secuencia nucleotídica de un gen supone la caracterización máxima de su estructura genética. Uno de los requisitos para la secuenciación de un DNA es que podamos obtener fragmentos definidos de ese DNA. Por ello, existe una dependencia entre las tecnologías de clonación y de secuenciación de DNA, ya que la clonación proporciona muestras amplificadas de fragmentos concretos de DNA.

Cualquiera de los métodos de secuenciación comienza con una población compuesta por un fragmento concreto de DNA marcado en un extremo. A partir de esta población, se genera una colección de moléculas cuyo tamaño difiere en una sola base (en el extremo no marcado). A continuación, estas moléculas se fraccionan mediante electroforesis en geles de acrilamida o de agarosa, tras ser convertidas en moléculas de DNA de cadena sencilla. La movilidad de una cadena es inversamente proporcional al logaritmo de su longitud. Esta técnica es tan sensible que permite la separación de fragmentos cuya longitud difiere en un único nucleótido. Para establecer la secuencia de nucleótidos, se determina la base que ocupa la última posición en el extremo marcado de las moléculas fraccionadas.

El método de secuenciación que se utiliza más frecuentemente es el desarrollado por Fred Sanger. Este método se basa en la síntesis de DNA en presencia de didesoxinucleósidos, que a diferencia de los desoxinucleótidos normales carecen de un grupo 3'-hidroxilo (Fig. 12-21). Los didesoxinucleósidos trifosfatados (ddNTP) pueden incorporarse a la cadena creciente; pero, una vez incorporados, provocan la terminación de la síntesis porque carecen del grupo 3'-hidroxilo necesario para que se establezca el enlace con el siguiente nucleósido trifosfatado. Se preparan cuatro reacciones, cada una de ellas con DNA molde de la secuencia de interés en forma de cadena sencilla, DNA polimerasa y un cebador marcado. A cada reacción se le añade una pequeña cantidad de un ddNTP diferente (ddATP, ddTTP, ddCTP o

Base

No puede establecer un enlace fosfodiéster con el dNTP entrante

Figura 12-21. Estructura de los 2', 3'-didesoxinucleótidos, que se usan en el método de secuenciación desarrollado por Sanger.

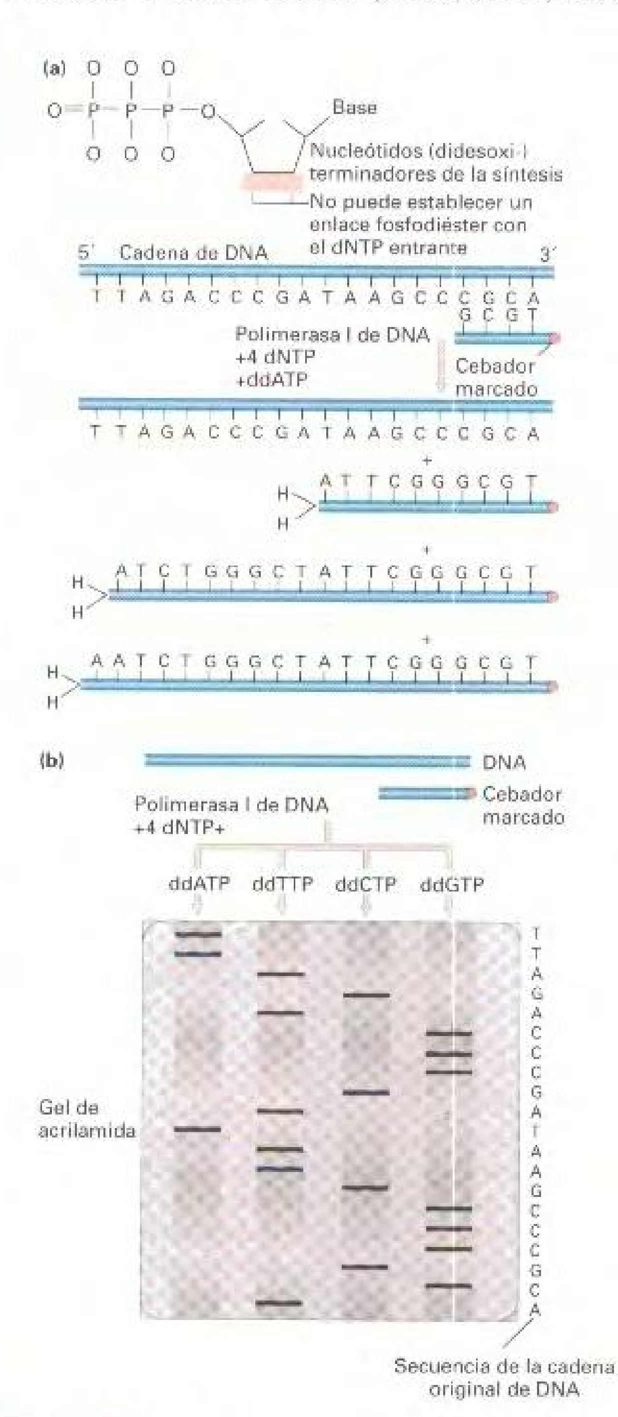


Figura 12-22. El método de secuenciación con didesoxinucleótidos. (a) Para iniciar la síntesis, se utiliza un cebador marcado (correspondiente a una secuencia del vector próxima a uno de los puntos de unión con el inserto). La adición de cada uno de los cuatro didesoxinucleótidos (en este caso, se ilustra el proceso con ddATP) detiene la síntesis aleatoriamente. (b) Los fragmentos resultantes se separan por electroforesis y se someten a autorradiografía. (Tomado de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de Scientific American Books.)

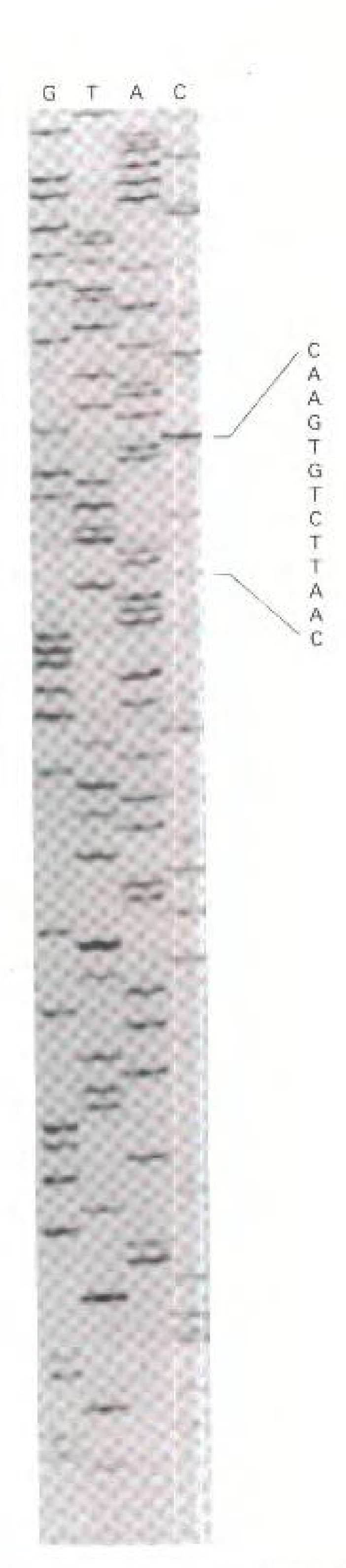


Figura 12-23. Gel de secuenciación por el método de Sanger. A la derecha se muestra parte de la secuencia de DNA inferida. (Fotografía de Loida Escote-Carlson).

ddGTP), además de los cuatro desoxinucleósidos trifosfatados normales (dNTP). La incorporación de un desoxinucleótido ocurre al azar, en diferentes posiciones de las diferentes moléculas sintetizadas en un tubo de reacción. De este modo, en cualquiera de los tubos, se producirán toda una serie de productos truncados de diferente tamaño, coincidiendo la posición de la terminación con la incorporación del didesoxinucleótido correspondiente. A su vez, las longitudes de las cadenas ponen de manifiesto la localización de las bases complementarias a los ddNTP en la cadena molde. Dado que la incorporación ocurre al azar, se producirán todos los productos truncados posibles, correspondientes a todas las posiciones en las que aparece esa base concreta. Los fragmentos pueden visualizarse mediante electroforesis de las cuatro muestras en cuatro carriles diferentes de un gel de acrilamida, donde los fragmentos aparecen como bandas. Examinando los cuatro carriles del gel e identificando qué base ocupa el extremo de cada una de las bandas consecutivas puede determinarse la secuencia. Las Figuras 12-22 y 12-23 ilustran el proceso.

El marcaje radiactivo puede sustituirse por el marcaje de los cebadores con compuestos fluorescentes. En cada una de las cuatro reacciones se emplea un colorante fluorescente diferente, de manera que las cuatro reacciones pueden depositarse en un mismo carril y someterse conjuntamente a electroforesis. La secuenciación automática se basa en la detección inequívoca de esta fluorescencia, permitiendo la lectura de hasta 1000 bases en una única reacción. La Figura 12-24 ilustra la lectura de un cromatograma obtenido por secuenciación automática.

COROLARIO

Un fragmento de DNA clonado puede secuenciarse mediante la obtención de un conjunto de fragmentos marcados de cadena sencilla cuya longitud difiere en un solo nucleótido; cuando estos DNA se someten a electroforesis, la secuencia de nucleótidos puede leerse directamente a partir del autorradiograma del gel.

La secuencia nucleotídica de un fragmento de DNA puede utilizarse para determinar qué gen o genes clonados contiene. Para ello, se introduce la secuencia de nucleótidos en un ordenador, que la analiza en las seis pautas de lectura (tres en cada dirección) en busca de un tramo de DNA suficientemente largo y que comience con un codón iniciador ATG y finalice con un codón terminador. Los tramos de DNA que cumplen estas condiciones se denominan **tramos de lectura abierta** (**ORF**, del inglés *Open Reading Frames*) y representan secuencias candidatas a ser genes. La Figura 12-25 muestra este tipo de análisis, en el que se identifican dos ORF y, por consiguiente, dos posibles genes. Merece la pena resaltar que la detección de ORF y el análisis mendeliano de segregaciones fenotípicas son dos métodos igualmente válidos para la identificación de genes, a pesar de las diferencias inherentes a cada estrategia.

Detección y amplificación de secuencias por el método de amplificación en cadena de la polimerasa

Si una región de DNA ya se ha clonado y secuenciado, la secuencia puede utilizarse para obtener tramos de dicha región a

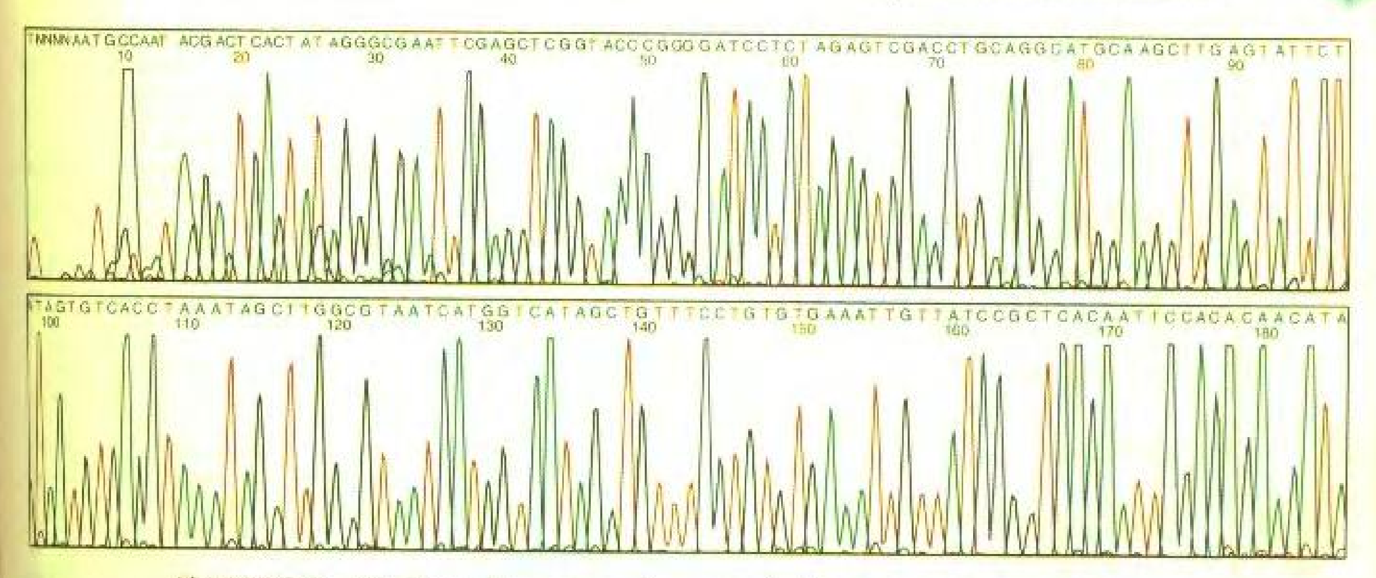


Figura 12-24. Copia impresa del cromatograma y la secuencia obtenida con un secuenciador automático que utiliza compuestos fluorescentes como marca. N representa una base sin asignar.

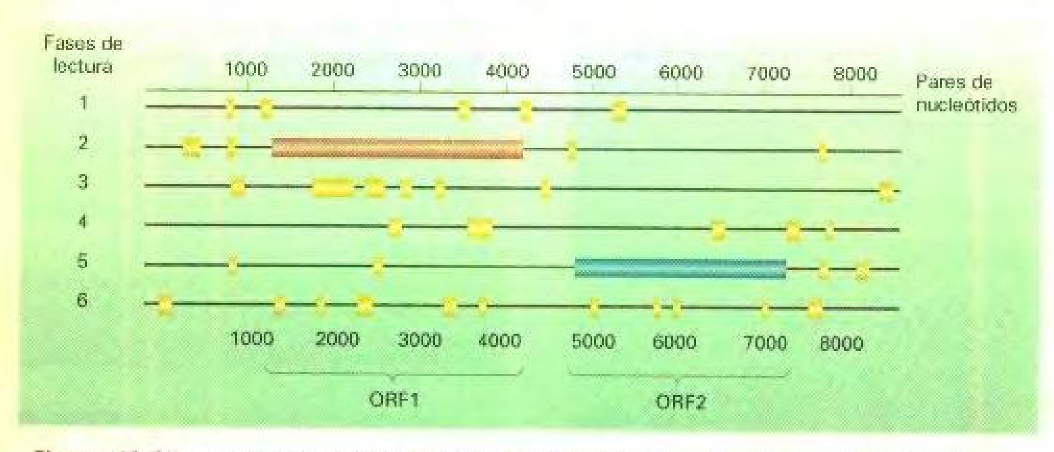


Figura 12-25. Cualquier segmento de DNA tiene seis pautas de lectura posibles, tres en cada dirección. En el ejemplo, el ordenador ha analizado una secuencia de 9-kb de un plásmido de hongos en busca de ORF (genes potenciales). Hay dos ORF, el 1 y el 2, que por su mayor tamaño podrían corresponder a genes.

partir de individuos concretos de esa o de otra especie, sin necesidad de clonarlos. La técnica de basa en un procedimiento denominado **reacción en cadena de la polimerasa** (**PCR**, del inglés *Polymerase Chain Reaction*). La Figura 12-26 ilustra las bases de esta técnica. Para catalizar la extensión de los cebadores, se utiliza una polimerasa de DNA termoestable, la *Taq* polimerasa, obtenida a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*. Como se muestra en la Figura 12-26, la polimerasa extiende en modo convergente a partir de dos cebadores que hibridan con cadenas opuestas. Una vez completada la replicación del segmento delimitado por los dos cebadores (primer ciclo), las dos moléculas nuevas de cadena doble se desnaturalizan por calor y se procede a un segundo ciclo de replicación, tras bajar la temperatura en presencia de todos los componentes necesarios para la polimerización. La repetición de los ciclos de síntesis y desnaturalización lleva a un aumento exponencial del número de segmentos replicados. Resulta fácil conseguir niveles de amplificación de hasta un millón. La utilización de la técnica de PCR permite la amplificación de un gen de copia única a partir de una muestra genómica, siempre que podamos sintetizar cebadores complementarios a secuencias conocidas del gen. Debido a la amplificación exponencial, la PCR es una técnica muy sensible, que permite detectar secuencias que se encuentran mínimamente representadas en una muestra. Por ejemplo, se pueden amplificar segmentos de DNA humano a partir de las pocas células foliculares que rodean a un solo pelo. La PCR resulta muy útil en el diagnóstico del DNA, en otras palabras, en la comprobación de la presencia de un gen o de una mutación en un gen específico o, al nivel preparativo, en la amplificación de un segmento determinado.

Advierta que la técnica de PCR no requiere la digestión del sustrato con enzimas de restricción, ya que los cebadores se encargan de encontrar la secuencia adecuada en el DNA nativo. Además, podemos prescindir de experimentos de clonación tediosos, porque se sintetiza DNA suficiente para producir una

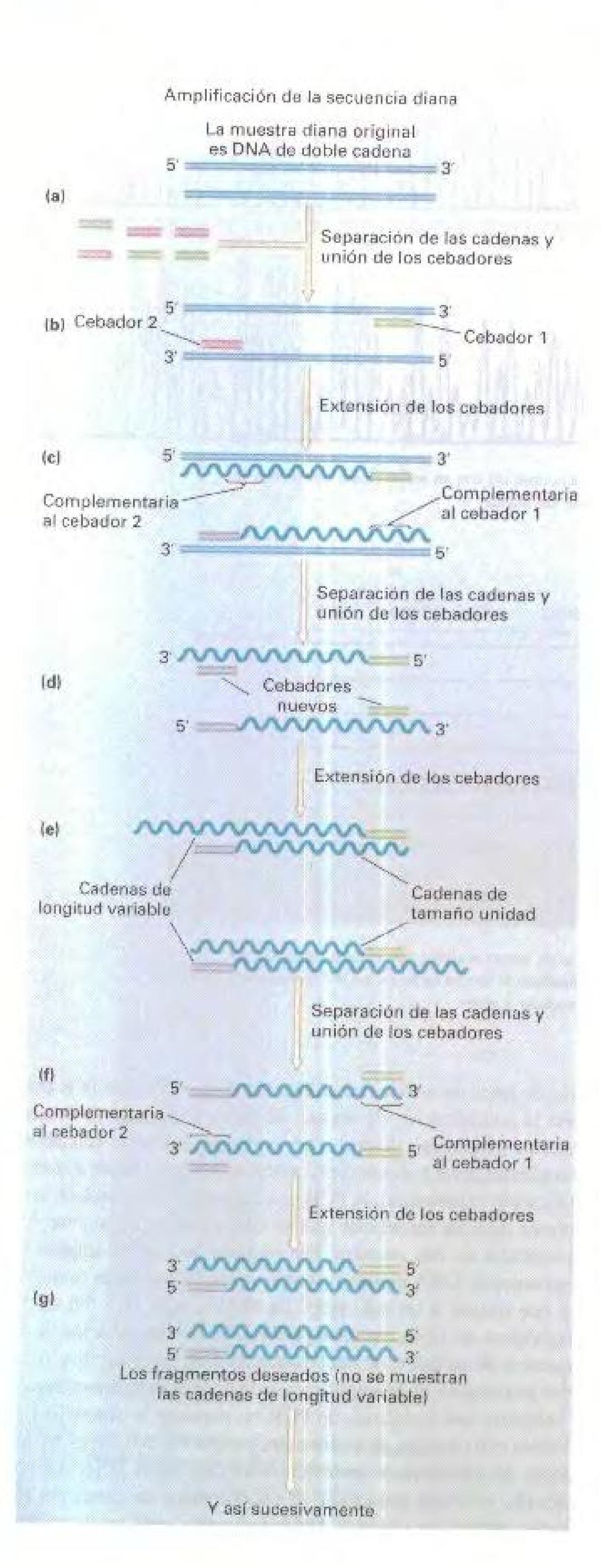


Figura 12-26. La reacción en cadena de la polimerasa. (a) DNA de doble cadena que contiene la secuencia diana. (b) Dos cebadores sintéticos cuyas secuencias son complementarias a los extremos 3' de la secuencia que se desea amplificar. Las cadenas se separan por calentamiento, permitiendo que los cebadores se unan a sus secuencias complementarias. De este modo, los cebadores delimitan la secuencia diana. (c) La polimerasa *Taq* sintetiza las primeras cadenas complementarias de la reacción. Estas dos primeras cadenas tienen un tamaño variable, debido a que carecen de una señal de terminación común, y se extienden más allá de la secuencia diana delimitada por los cebadores. (d) Las moléculas de doble cadena se desnaturalizan de nuevo, exponiendo cuatro sitios de unión de los cebadores. (Para simplificar sólo se muestran las dos cadenas de nueva síntesis). Los dos cebadores vuelven a unirse a las secuencias complementarias en los extremos 3' de la región diana. (e) La polimerasa *Taq* sintetiza dos cadenas complementarias. Aunque las cadenas moldes en este paso son de longitud variable, las dos cadenas que se sintetizan a partir de ellas ya tienen exactamente la longitud de la secuencia diana. Esto se debe a que cada cadena nueva comienza donde se une el cebador, *en un extremo de la secuencia diana*, y continúa hasta alcanzar el final del molde, *en el otro extremo de la secuencia diana*. (f) Ahora cada cadena comienza con la secuencia de uno de los cebadores y termina con la secuencia del otro. Tras la separación de las cadenas, los cebadores vuelven a unirse y, ahora, la reacción de extensión produce moléculas de doble cadena que corresponden a la secuencia diana. (Las cadenas de longitud variable del paso c también están produciendo moléculas del tamaño adecuado). (g) El proceso puede repetirse indefinidamente, produciendo cada vez dos moléculas de doble cadena idénticas a la secuencia diana. (Tomado de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de Scientific American Books.)

banda nítida en un gel. Aún más, se requieren cantidades ínfimas del DNA sustrato.

COROLARIO

La reacción en cadena de la polimerasa utiliza cebadores diseñados especialmente para amplificar una región concreta de DNA sin necesidad de clonarla.

Localización de genes en mapas de restricción

Hemos visto ya la importancia de las enzimas de restricción en la digestión del DNA para su clonación. Otra característica de las enzimas de restricción es que las posiciones de sus sitios diana a lo largo de una molécula de DNA (es decir, a lo largo de un cromosoma) pueden utilizarse como marcadores de DNA. Aun cuando las dianas ocurren por azar, suelen ocupar posiciones equivalentes en cromosomas homólogos. Por lo tanto, las posiciones de los sitios diana tienen una utilidad comparable a la de los mojones a lo largo de una carretera, que aunque por sí mismos carecen de importancia, sirven para localizar otros puntos a lo largo del camino que sí son importantes. Por ello, el mapa de las posiciones de las dianas de restricción suele ser una herramienta valiosa en el análisis genómico. En la mayoría de las ocasiones, se construye un mapa de restricción para una determinada región cromosómica de interés o para un cromosoma relativamente pequeño como el de un plásmido o un orgánulo.

Un método para la elaboración de mapas de restricción consiste en comparar las digestiones con una sola enzima con las digestiones dobles. Las dos enzimas se añaden por separado a dos reacciones independientes, y juntas a una tercera reacción. Después de la digestión, se separan los fragmentos por electroforesis y se det

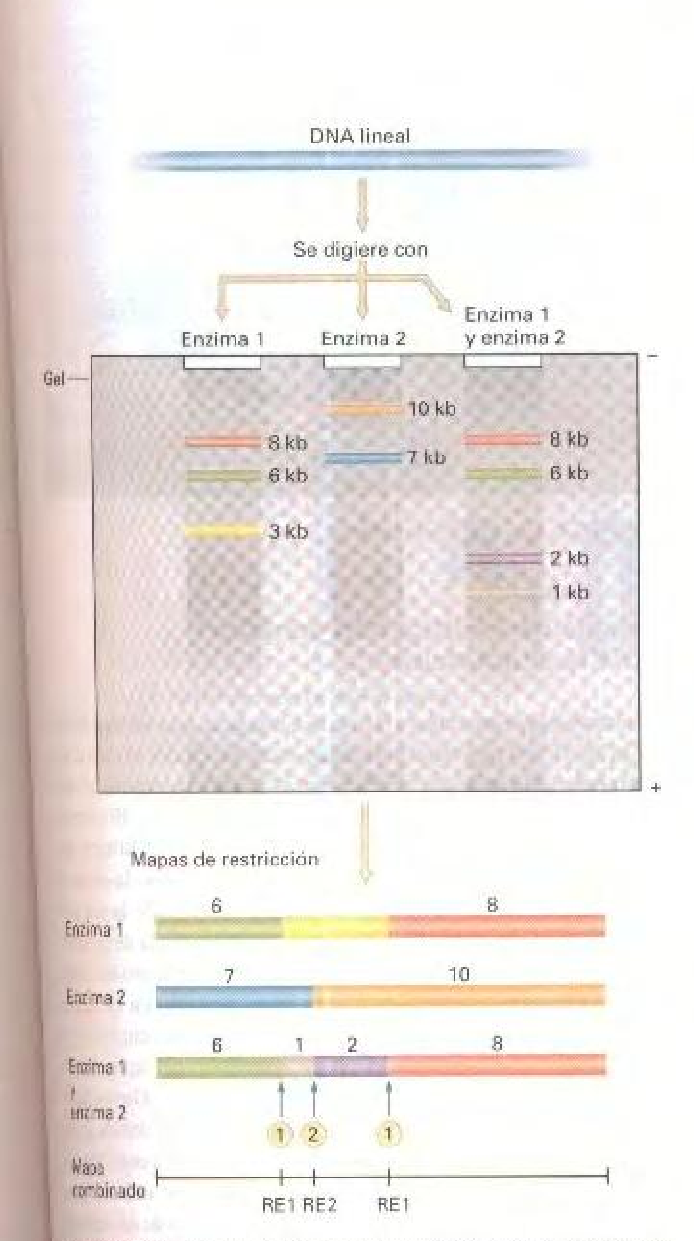


Figura 12-27. Elaboración de mapas de restricción mediante comparación de los fragmentos observados tras la separación electroforética de digestiones únicas y múltiples. En este ejemplo simplificado, la digestión con la enzima 1 indica que existen dos sitios de corte para esta enzima, pero no permite discernir si el fragmento de 3 kb está en la parte central o terminal de la secuencia digerida, que mide 17 kb. La digestión conjunta con las enzimas 1 y 2 deja intactos los fragmentos de 6 y 8 kb pero corta el fragmento de 3 kb, lo que indica que la enzima 2 tiene un punto de corte en este fragmento. Si el fragmento de 3 kb estuviera localizado en un extremo de la secuencia estudiada, la digestión con sólo la enzima 2 generaría un fragmento de 1 o 2 kb. Como no ocurre así, de los tres fragmentos producidos por la enzima 1, el de 3 kb debe estar situado en el centro. Que el punto de corte para la enzima 2 (RE2) se encuentra más cerca del segmento de 6 kb que del de 8 kb puede inferirse del tamaño (7 y 10 kb) de los fragmentos obtenidos con dicha enzima.

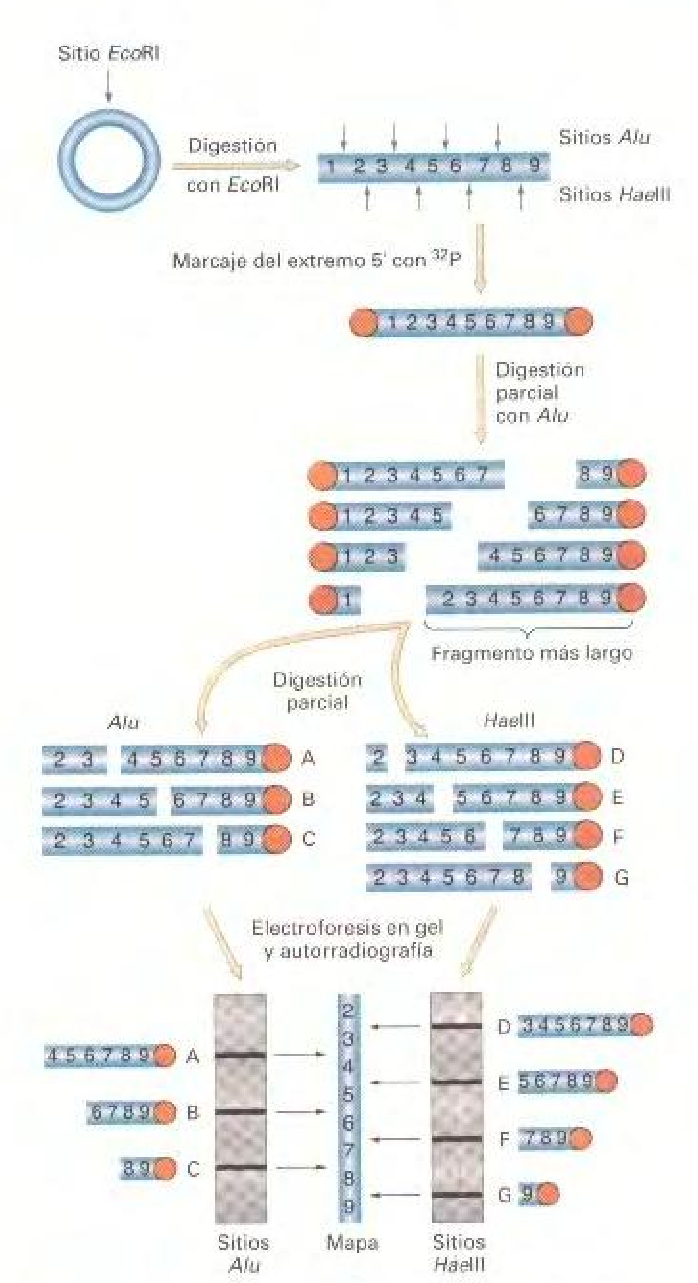


Figura 12-28. Identificación del orden de los sitios de restricción en una molécula de DNA circular. En el ejemplo, la digestión con *Eco*RI de la molécula circular (con un único sitio de corte para esta enzima) provoca su apertura. Esta molécula lineal se marca en sus extremos 5' con ^{32}P y se digiere parcialmente con *Alu* (enzima de restricción de *Arthrobacter luteus*, que igualmente podría ser *Hae*III, una enzima de restricción de *Haemophilus aegyptius*) para producir fragmentos de longitudes variables. Cada fragmento estará marcado ahora en un solo extremo. Se elige el fragmento más grande (tras comparar las longitudes en un gel) y se divide en dos muestras. Una muestra se digiere parcialmente con *Alu* y la otra parcialmente con *Hae*III. El nuevo conjunto de fragmentos se separa por electroforesis en gel. La localización de los fragmentos marcados puede determinarse por autorradiografía de los geles. Comparando el orden de los fragmentos en los dos geles puede leerse la secuencia de los sitios de restricción.

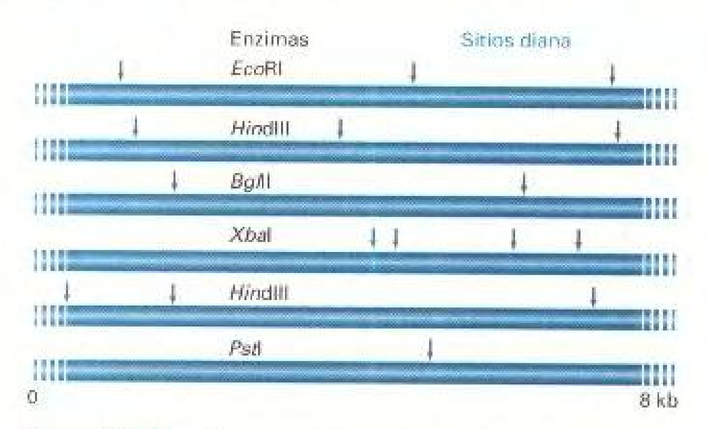


Figura 12-29. Mapa de restricción de un plásmido lineal de un hongo, con sitios de restricción para seis enzimas diferentes.

mina su tamaño. La digestión doble permite inferir si un fragmento de restricción producido por una enzima contiene sitios de restricción para la otra enzima; si es así, el fragmento desaparece y, en su lugar, aparecen dos o más fragmentos de menor tamaño. La comparación de los tamaños de los fragmentos producidos en las diferentes digestiones permite localizar de forma aproximada los sitios de restricción. La Figura 12-27 ilustra el procedimiento.

En la Figura 12-28 se muestra otro método para construir mapas de restricción. Este método parte de un fragmento de DNA marcado en los dos extremos 5′ con ^{32}P, que se corta para generar fragmentos marcados en un solo extremo. El fragmento más largo se aísla y se digiere con una segunda enzima de restricción, sin dejar que la reacción se complete; de este modo, se obtiene una población de fragmentos marcados y de tamaño variable, cada uno de ellos indicativo de la presencia en el extremo no marcado de uno de los varios sitios de restricción para la segunda enzima. La separación electroforética de estos fragmentos permite deducir la distancia entre el extremo marcado y la posición del sitio de restricción. En la Figura 12-29 se muestra un ejemplo de mapa de restricción, correspondiente al mapa del DNA de un plásmido lineal de hongos.

Después de que se haya elaborado un mapa de restricción, los genes pueden colocarse en el mapa mediante análisis por la técnica de Southern. Por ejemplo, si un gen clonado hibrida con un fragmento A producido por la enzima de restricción 1 y con el fragmento B producido por la enzima de restricción 2, entonces el gen debe estar situado en la región donde los dos fragmentos solapan.

En este capítulo, hemos presentado las técnicas fundamentales que han revolucionado la Genética. En el siguiente apartado se describe el análisis genético de la enfermedad alcaptonuria, que incorpora e integra muchas de las técnicas descritas en este capítulo.

Los genes han dejado de ser entidades hipotéticas. Gracias a la tecnología del DNA recombinante y a tecnologías relacionadas, los genes pueden aislarse en un tubo de ensayo y caracterizarse como secuencias nucleotídicas específicas. Pero la historia no termina aquí. Veremos en el siguiente capítulo que el conocimiento de la secuencia no suele ser sino el principio de una nueva ronda de manipulación genética de dicha secuencia, basada en estrategias novedosas y sofisticadas que permiten alterar el fenotipo de un organismo.



Figura 12-30. Archibald Garrod.

Un siglo de investigación genética sobre la alcaptonuria

La alcaptonuria es una enfermedad humana que se manifiesta por la aparición de varios síntomas, entre los cuales el más conspicuo es que la orina se vuelve negra cuando se expone al aire. En 1898, el médico inglés Archibald Garrod (Fig. 12-30) demostró que la sustancia responsable era el ácido homogentísico, que era excretado en cantidades anormalmente altas en la orina de pacientes con alcaptonuria. En 1902, a principios de la era posmendeliana, Garrod analizó los patrones de herencia de la enfermedad y sugirió que la alcaptonuria se heredaba como un carácter mendeliano recesivo (Fig. 12-31). Poco después, en 1908, propuso que esta dolencia surgía por la falta de una enzima cuya función normal era romper el anillo aromático del ácido homogentísico y convertirlo en ácido maleilacetoacético. Garrod razonó que la acumulación de ácido homogentísico era debida a esta deficiencia enzimática. La alcaptonuria se encuentra entre los primeros casos propuestos de enfermedades debidas a «defectos congénitos del metabolismo», es decir, a la deficiencia de una enzima provocada por mutación en un gen. Transcurrieron 50 años hasta que otros investigadores demostraron la ausencia total de actividad de la enzima dioxigenasa del ácido homogentísico (HGO), la enzima que rompe el ácido homogentísico, en el hígado de los enfermos de alcaptonuria. Parecía lógico pensar que la enzima HGO sería el producto del gen responsable de la alcaptonuria. En 1992, por cartografía genética, se asignó el gen de la alcaptonuria a la banda 2 del brazo largo del cromosoma 3 (banda 3q2).

En 1995, José Fernández-Cañón y colaboradores caracterizaron un gen determinante de una actividad HGO en el hongo *Aspergillus nidulans* y, en 1996, utilizaron la secuencia de aminoácidos deducida a partir del gen para realizar una búsqueda por ordenador de proteínas homólogas entre un número elevado de fragmentos secuenciados de una genoteca humana de cDNA. Identificaron un clon positivo que contenía un gen humano cuyo

producto tendría 445 aminoácidos y con un 52 % de similitud respecto al gen de *Aspergillus*. Cuando el gen humano se expresó en un vector de expresión de *E. coli*, mostró actividad HGO. Aún más, cuando se utilizó el gen como sonda en un análisis del RNA de hígado por la técnica Northern, se observó hibridación con un único RNA del tamaño esperado.

Cuando se utilizó el gen clonado como sonda para analizar cromosomas parcialmente desnaturalizados (hibridación *in situ*, véase el Cap. 14), la sonda hibridó con la banda 3q2, demostrando que efectivamente se trataba del gen responsable de la alcaptonuria.

El clon de cDNA se utilizó para recuperar el gen completo a partir de una genoteca genómica. Se encontró que el gen contenía 14 exones y se extendía un total de 60 kb. Se analizó la presencia de mutaciones en una familia de siete individuos en la que tres de los hijos padecían alcaptonuria. Mediante PCR, se amplificaron los exones uno a uno y se secuenciaron los productos amplificados. Uno de los padres resultó ser heterocigótico para un cambio de prolina → serina en la posición 230 de la proteína (mutación P230S), correspondiente a una mutación en el exón 10. El otro progenitor resultó ser heterocigótico para el cambio valina → glicina en la posición 300 de la proteína (mutación V300G), correspondiente a un mutación en el exón 12. Los tres hijos con alcaptonuria presentaron la constitución genética P230S/V300G, como cabría esperar si fueran éstas las posiciones mutadas responsables de la inactividad de la enzima.

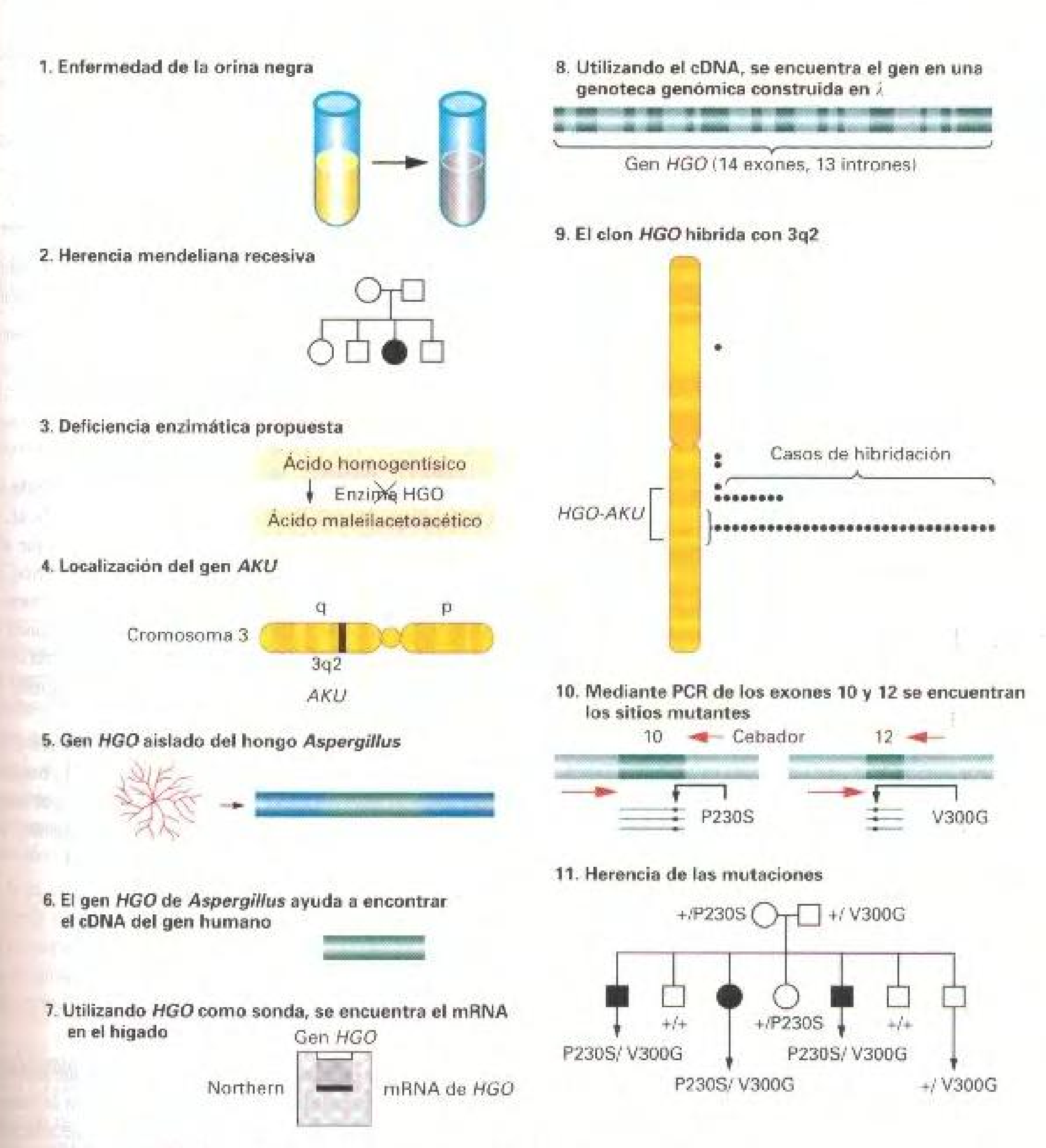


Figura 12-31. El análisis de la alcaptonuria (enfermedad de la orina negra).

RESUMEN

La Genética se centra en el análisis de la naturaleza de los genes, y uno de los principales objetivos es la caracterización de su estructura y función. La tecnología del DNA recombinante ha permitido aislar genes individuales en un tubo de ensayo para su caracterización molecular. Esta tecnología se basa en el uso de las enzimas de restricción, que cortan el DNA en fragmentos específicos. Los sitios diana de las enzimas de restricción pueden situarse en un mapa y servir de marcadores del DNA. A menudo, los fragmentos de restricción presentan extremos cohesivos que facilitan su inserción en un vector capaz de replicarse en una célula bacteriana. Estas moléculas híbridas se denominan DNA recombinante. Las bacterias amplifican una molécula recombinante individual y así dan lugar a un clon. Entre los vectores más comunes se encuentran los plásmidos, los fagos y los cósmidos. Se puede clonar todo el genoma en una población de clones denominada genoteca. Un clon determinado de una genoteca puede identificarse utilizando una sonda que se una específicamente al DNA o a la proteína del clon de interés. También pueden aislarse clones específicos por su capacidad de transformar mutantes nulos. La adición de etiquetas también resulta útil para clonar un gen: se provocan mutaciones por inserción de DNA transformante o de un transposón y luego se clona el DNA adyacente a la etiqueta. La técnica de paseo cromosómico permite aislar un gen mediante el aislamiento secuencial de clones solapados, partiendo de un marcador ligado al gen de interés. El DNA clonado puede secuenciarse por varios métodos, entre los que se incluye la terminación del crecimiento de la cadena por la inserción de un didesoxinucleótido. La reacción en cadena de la polimerasa utiliza cebadores para amplificar una secuencia. Este método permite aislar rápidamente un DNA cuya estructura se ha secuenciado parcialmente y detectar pequeñas cantidades de un tipo de DNA específico. Una mezcla de moléculas de DNA o RNA de diferentes tamaños puede separarse por electroforesis en gel. La utilización de sondas permite detectar moléculas específicas de DNA o RNA en el gel, mediante las técnicas de Southern y Northern, respectivamente.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

enzima de restricción / DNA recombinante / clon de DNA / sonda / transformación / vector / complementación / secuenciación / genoteca

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

En el Capítulo 10, estudiamos la estructura de las moléculas de tRNA. Suponga que está interesado en clonar un gen de hongos que determine un tRNA concreto. Dispone de una muestra de tRNA purificado y de un plásmido de *E. coli* que contiene un gen que confiere resistencia a tetraciclina (tet^R), con un único punto de corte para *Eco*RI, y un gen que confiere resistencia a ampicilina (amp^R). ¿Cómo clonaría el gen de interés?

♦ Solución ♦

Podría utilizar el propio tRNA, o una copia del mismo en cDNA, como sonda para buscar el gen correspondiente. Un método consistiría en digerir el DNA genómico con *Eco*RI y luego mezclarlo con el plásmido, también cortado con *Eco*RI. La aparición de colonias Amp^R tras transformar una estirpe recipiente amp^S tet^S es indicativa de que la transformación ha sido eficaz. De estas colonias Amp^R, habría que seleccionar aquellas que sean Tet^S. Estas colonias Tet^S contendrán vectores con insertos, y para la construcción de la genoteca necesitaríamos un número elevado de ellos. La genoteca habría que analizarla utilizando el tRNA como sonda. Las colonias que hibriden con la sonda se examinarían para averiguar cuánta secuencia correspondiente al tRNA contienen.

Alternativamente, podría someter a electroforesis DNA de un organismo X digerido con *Eco*RI e identificar la banda correcta utilizando el tRNA como sonda. La región del gel que hibride, enriquecida en el DNA de interés, podría cortarse y utilizarse para clonar en el plásmido digerido con *Eco*RI.

PROBLEMAS RESUELTOS

1. La enzima de restricción *Hin*dIII corta el DNA en la secuencia AAGCTT, y *Hpa*II corta en la secuencia CCGG. Por término medio, ¿con qué frecuencia cortará cada una de estas enzimas en un DNA de doble cadena? (En otras palabras, ¿cuál sería la separación media entre los sitios de restricción?)

♦ Solución ♦

Debemos tener en cuenta una sola cadena, ya que ambas secuencias estarán presentes en la misma posición en la cadena complementaria, dado el carácter simétrico de las secuencias. La secuencia de seis pares de bases reconocida por *Hin*dIII aparecerá

con una frecuencia de $(1/4)^6 = 1/4096$, ya que existen cuatro posibilidades en cada una de las seis posiciones. Por consiguiente, la distancia media entre los sitios *Hin*dIII sería aproximadamente 4 kb. Para *Hpa*II, la frecuencia de aparición de su secuencia diana de cuatro pares de bases sería $(1/4)^4$, o 1/256. La separación media entre los sitios *Hpa*II sería aproximadamente 0.25 kb.

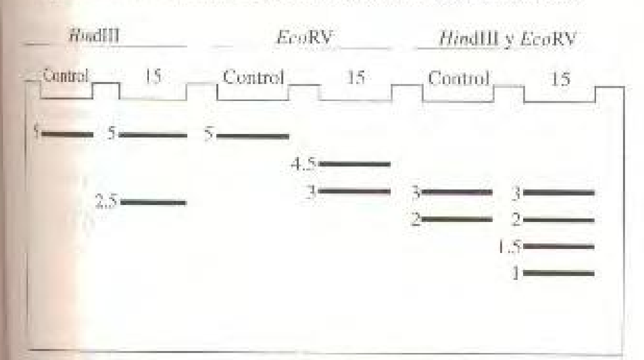
2. Con los datos del Cuadro 12-1, determine si sería más útil la enzima *Eco*RI o la enzima *Sma*I para clonar. Explique su respuesta.

• Solución •

Ambas enzimas de restricción reconocen una secuencia de seis pares de bases, así que esperíamos que la frecuencia de aparición de sus sitios diana fuera aproximadamente la misma. La principal diferencia entre las dos enzimas es que *Eco*RI deja extremos cohesivos, mientras que *Sma*I genera extremos romos. La manipulación de los extremos cohesivos durante la clonación es mucho más fácil, dada su capacidad inherente para establecer emparejamientos entre bases. (Solución propuesta por Diane K. Lavett).

PROBLEMAS

1. Un plásmido bacteriano circular (pBP1) contiene un sitio de restricción *Hin*dIII en medio del gen de resistencia a tetraciclina (tet^R). Se digiere DNA genómico de la mosca del vinagre con *Hin*dIII y se construye una genoteca en pBP1. Por hibridación con una sonda se detecta que el clon 15 contiene un gen de *Drosophila* en el que estamos interesados. Se estudia el clon 15 por análisis de restricción con *Hin*dIII y *Eco*RV. El diagrama muestra las bandas teñidas con bromuro de etidio tras la electroforesis (el control corresponde al plásmido pBP1 sin inserto). Al lado de cada banda se indica su tamaño en kilobases. (**Nota:** las moléculas circulares no dan bandas intensas en este tipo de gel, así que puede asumir que todas las bandas representan moléculas lineales.)



a. Dibuje los mapas de restricción del plásmido pBP1 con y sin inserto, indicando los sitios de las secuencias diana y la posición aproximada del gen tet^R.

b. Si el gen tet^R, clonado en un vector completamente homólogo, se marca radiactivamente y se utiliza como sonda en una transferencia de este gel por la técnica de Southern, ¿qué bandas esperaría que apareciesen radiactivas en el autorradiograma?

c. Si se clona en un vector no homólogo el mismo gen de interés a partir de una mosca estrechamente relacionada con *Drosophila*, y se utiliza este clon como sonda para analizar el mismo gel, ¿qué bandas esperaría ver en el autorradiograma?

El problema paso a paso

1. ¿Qué tipo de plásmido de los descritos en este capítulo se parece más a pBP1?

2. ¿Qué importancia tiene el único sitio de restricción *Hin*dIII?

3. ¿Por qué es importante que el sitio único se encuentre localizado en un gen de resistencia? ¿Sería útil si no lo estuviera?

4. ¿Qué efecto tiene la inserción de DNA donante en el gen de resistencia? ¿Tiene importancia este efecto en el contexto del problema?

5. ¿Qué es una genoteca? ¿Qué tipo de genoteca se utilizó en este experimento? ¿Importa el tipo de genoteca para este problema?

6. ¿Qué tipo de análisis habría demostrado que el clon 15 contiene el gen de interés? ¿Tiene relevancia para este problema?

7. ¿Qué es un gel electroforético?

8. ¿Qué función tiene el uso de bromuro de etidio en este experimento?

9. ¿Corresponden los resultados de la transferencia a un experimento realizado por la técnica Southern, Northern, o ninguna de las dos?

10. Genéricamente, ¿qué tipo de moléculas se observan en el gel?

11. ¿Cuántos fragmentos se producen si una molécula circular se corta una vez?

12. ¿Cuántos fragmentos se producen si una molécula circular se corta dos veces?

13. ¿Sería capaz de deducir una fórmula sencilla que relacione el número de sitios de restricción en una molécula circular con el número de fragmentos producidos?

14. Si una enzima produce *n* fragmentos y otra produce *m* fragmentos, ¿cuántos fragmentos se producirían si se usan ambas enzimas?

15. En el diagrama, ¿en qué posiciones se cargaron las muestras de DNA en el gel?

16. ¿Por qué los fragmentos de menor tamaño molecular se encuentran en la parte inferior del gel?

17. ¿Cuál es el peso molecular total de los fragmentos en todos los carriles? ¿Qué patrones observa?

18. ¿Es una coincidencia que los fragmentos de 3 y 2 kb juntos sumen el fragmento de 5 kb?

19. ¿Es una coincidencia que los fragmentos de 1.5 y 1 kb juntos sumen el fragmento de 2.5 kb?

20. Si un fragmento generado por una enzima desaparece cuando el DNA se trata con esa misma enzima y con otra enzima adicional, ¿qué significado tiene?

21. ¿Qué determina que una sonda hibride o no con un filtro de DNA (desnaturalizado)?

22. En el apartado c, ¿por qué se hace hincapié en que se utilizó un vector no homólogo?

Ahora puede intentar resolver el problema.

2. La enzima de restricción *Eco*RI corta el DNA en la secuencia GTTAAC y la enzima *Hae*III corta el DNA en la secuencia GGCC. Por término medio, ¿con qué frecuencia cortará cada enzima en un DNA de doble cadena? (En otras palabras, ¿cuál será la separación media entre los sitios de restricción?).

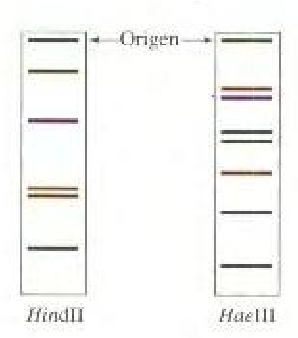
3. Dispone de una molécula purificada de DNA y desea elaborar un mapa de restricción para este DNA. Tras digerir con *Eco*RI, obtiene cuatro fragmentos: 1, 2, 3 y 4. Tras digerir cada uno de estos fragmentos con *Hin*dIII, encuentra que el fragmento 3 se descompone en dos subfragmentos (3_1 y 3_2) y el fragmento 2 en tres (2_1, 2_2 y 2_3). Tras digerir la molécula completa con *Hin*dIII, obtiene cuatro fragmentos: A, B, C y D. Cuando estos fragmentos se tratan con *Eco*RI, el fragmento D genera los fragmentos 1 y 3_1, A genera 3_2 y 2_1, y B genera 2_3 y 4. El fragmento C coincide con el 2_2. Elabore un mapa de restricción para este DNA.

4. Después de tratar el DNA de *Drosophila* con una enzima de restricción, los fragmentos se insertan en un plásmido y los clones se seleccionan en *E. coli*. Utilizando esta técnica «de la perdigonada», David Hogness construyó una genoteca representativa de todas las secuencias de *Drosophila*.

a. ¿Cómo identificaría el clon que contiene el gen que determina la actina, cuya secuencia de aminoácidos se conoce?

b. ¿Cómo identificaría un clon que determine un tRNA concreto?

5. Suponga que ha aislado y clonado un segmento de DNA de secuencia única en el genoma. Se encuentra localizado cerca del extremo del cromosoma X y mide unas 10 kb. Marca los extremos 5' con ^{32}P y digiere la molécula con *Eco*RI. Obtiene dos fragmentos: uno de 8.5 kb y el otro de 1.5 kb. Separa el fragmento de 8.5 kb en dos fracciones, una la digiere parcialmente con *Hae*III y la otra con *Hin*dII. Separa las muestras por electroforesis en un gel de agarosa y la autorradiografía muestra los resultados siguientes:



Dibuje un mapa de restricción de la molécula completa de 10 kb.

6. Calcule las distancias medias (en pares de nucleótidos) entre los sitios diana para los siguientes sitios de restricción en el organismo X:

*Alu*I	5' AGCT 3'
	3' TCGA 5'
*Eco*RI	5' GAATTC 3'
	3' CTTAAG 5'
*Acy*I	5' G Pu CG Py C 3'
	3' C Py GC Pu G 5'

(**Nota:** Py = cualquier pirimidina; Pu = cualquier purina.)

7. Se digiere un fragmento de DNA por separado con *Hin*dIII y con *Sma*I, y conjuntamente con las dos enzimas. Se obtienen los siguientes fragmentos:

*Hin*dIII	2.5 kb, 5.0 kb
*Sma*I	2.0 kb, 5.5 kb
*Hin*dIII y *Sma*I	2.5 kb, 3.0 kb, 2.0 kb

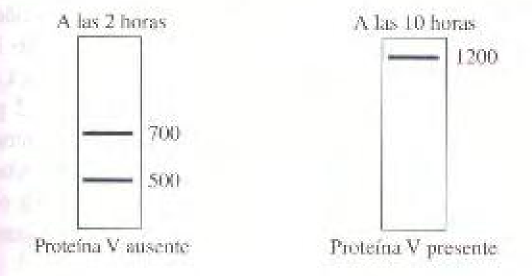
a. Dibuje el mapa de restricción.

b. Cuando la mezcla de fragmentos producida en la digestión con las dos enzimas se digiere con *Eco*RI, se observa la pérdida del fragmento de 3 kb (por tinción con bromuro de etidio de las bandas en un gel de agarosa) y la aparición de una banda de 1.5 kb. Sitúe el punto *Eco*RI en el mapa de restricción.

(El problema 7 es cortesía de Joan McPherson. De A. J. F. Griffiths y J. McPherson, *100+ Principles of Genetics*. W. H. Freeman and Company, 1989.)

8. Un fragmento de DNA viral portador de un gen específico se introduce en una célula muscular en cultivo mediante transformación. Tras la incubación con ribonucleótidos marcados con ^{32}P, se aísla el RNA cifrado por el virus en dos momentos diferentes. El RNA viral marcado se somete al siguiente tratamiento. Primero, se hibrida con un cDNA sintetizado previamente a partir del mRNA maduro del gen viral *V*. Luego, el híbrido se trata con RNasa. Por último, el híbrido se desnaturaliza y se somete a electroforesis en un gel, que acaba analizándose por autorradiografía. Los

guientes resultados sugieren que la naturaleza patológica del virus varía en función del tiempo (se indica el tamaño, en nucleótidos, de las bandas observadas):



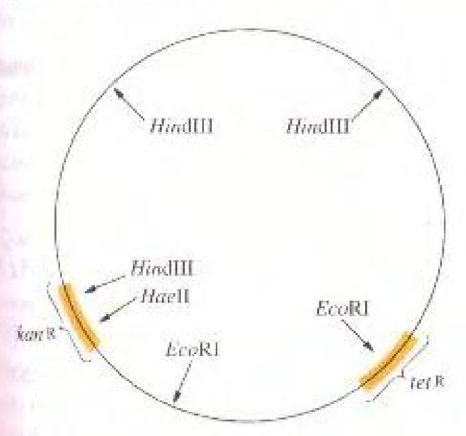
a. ¿Qué tamaño tiene el mRNA maduro del gen *V*?

b. Dibuje un diagrama de cada híbrido e indique qué representan las bandas.

c. ¿Por qué no se produce la proteína V hasta después de dos horas?

(El problema 8 es cortesía de Joan McPherson. De A. J. F. Griffiths y J. McPherson, *100+ Principles of Genetics*, W. H. Freeman and Company, 1989.)

9. Se ha clonado el gen de la β-tubulina de *Neurospora* y está disponible. Describa paso a paso un procedimiento para clonar el gen equivalente del hongo relacionado *Podospora*, utilizando como vector de clonación el plásmido de *E. coli* pBR que se muestra a continuación, donde *kan* = kanamicina y *tet* = tetraciclina:



10. Se ha cortado con *Bgl*II un plásmido bacteriano circular que contiene un gen de resistencia a tetraciclina. Tras la electroforesis, se observa una banda de 14 kb.

a. ¿Qué deduciría de este resultado?

El plásmido se ha cortado con *Eco*RV y produce dos bandas, de 2.5 y 11.5 kb.

b. ¿Qué deduciría de este resultado?

La digestión con las dos enzimas a la vez produce tres bandas, de 2.5, 5.5 y 6 kb.

c. ¿Qué deduciría de este resultado?

El DNA del plásmido cortado con *Bgl*II se ha mezclado y ligado con fragmentos de DNA donante obtenidos también tras digestión con *Bgl*II, para generar moléculas recombinantes. Todos los clones recombinantes resultaron ser resistentes a tetraciclina.

d. ¿Qué deduciría de este resultado?

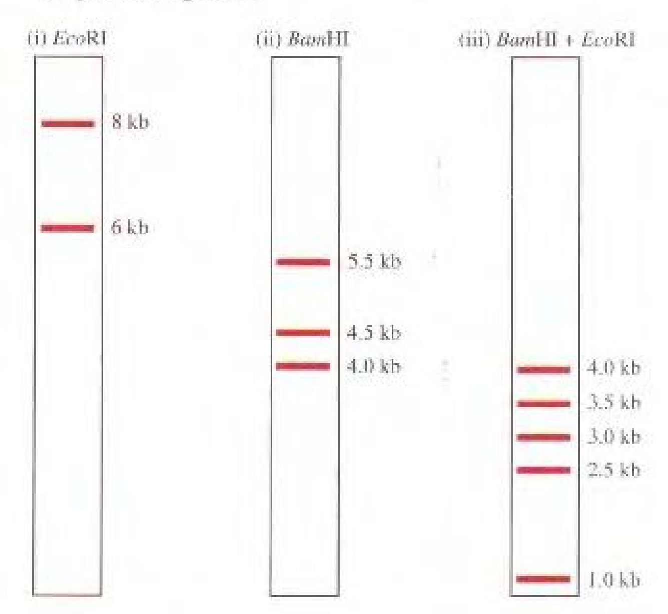
Tras cortar un clon recombinante con *Bgl*II, se observan dos fragmentos, de 4 y 14 kb.

e. Explique este resultado.

El mismo clon se ha tratado con *Eco*RV y se han producido fragmentos de 2.5, 7 y 8.5 kb.

f. Explique estos resultados mostrando un mapa de restricción del DNA recombinante.

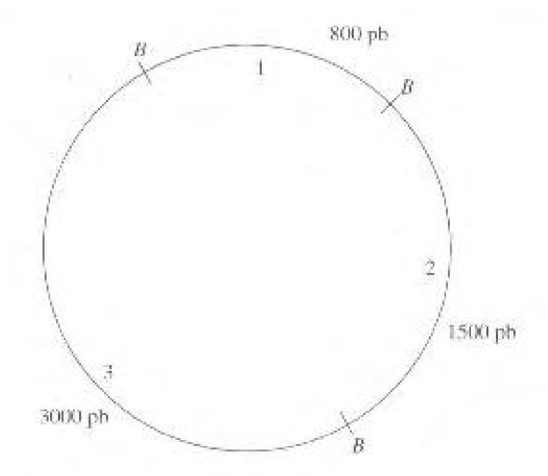
11. a. Un fragmento de DNA de ratón con extremos cohesivos *Eco*RI contiene el gen *M*. Este fragmento, que mide 8 kb, se inserta en el plásmido bacteriano pBR322 digerido con *Eco*RI. El plásmido recombinante se corta por separado con tres tratamientos distintos con enzimas de restricción. El siguiente diagrama muestra los patrones de tinción con bromuro de etidio después de la electroforesis en geles de agarosa:



El DNA en el gel (iii) se transfiere a un filtro para su análisis por la técnica de Southern. ¿Qué fragmentos hibridarán con una sonda (marcada con ^{32}P) de DNA del plásmido pBR?

b. El gen *X* se encuentra en un plásmido compuesto por 5300 pares de bases (5300 pb). La digestión del plásmido con la enzima de restricción *Bam*HI genera los fragmentos 1, 2 y 3, como se indica en el siguiente diagrama. (*B* = *Bam*HI). Sólo uno de los fragmentos *Bam*HI contiene copias en tándem del gen *X*. Si el gen *X* determina una proteína X de 400 aminoácidos, indique las posiciones y orientaciones aproximadas de las copias del gen *X*.

(El problema 11 es cortesía de Joan McPherson. De A. J. F. Griffiths y J. McPherson, *100+ Principles of Genetics*, W. H. Freeman and Company, 1989.)



12. En los análisis de complementación funcional tanto en procariotas como en eucariotas, la prototrofía suele ser el fenotipo que se selecciona para detectar los transformantes. Las células protótrofas se utilizan como donantes en la extracción de DNA; este DNA luego se clona, y los clones se añaden a un cultivo recipiente de una estirpe auxótrofa. Los transformantes que contienen el clon de interés se seleccionan sembrando el cultivo recipiente en medio mínimo. ¿Qué método experimental utilizaría para descartar que una colonia que espera sea un transformante resulte ser:

a. una célula protótrofa que ha contaminado el cultivo recipiente?

b. un revertiente de la mutación de auxotrofía?

13. En cualquier célula eucariótica transformada (por ejemplo, *Neurospora*), ¿cómo determinaría si el DNA transformante (integrado en un vector bacteriano circular)

a. ha sustituido al gen residente de la estirpe recipiente mediante uno o dos hechos de recombinación?

b. se ha insertado ectópicamente?

14. En un gel sometido a electroforesis de campo pulsante, el DNA del hongo haploide *Neurospora crassa* ($n = 7$) se mueve lentamente, pero con tiempo suficiente se separa en siete bandas (que representan fracciones de DNA de diferente tamaño y que, por ello, migran a velocidades diferentes). Se cree que estas bandas son los siete cromosomas. ¿Cómo demostraría qué banda corresponde a cada cromosoma?

15. Se marca el cromosoma lineal de un fago en ambos extremos con ^{32}P y se digiere con enzimas de restricción. *Eco*RI produce fragmentos de 2.9, 4.5, 6.2, 7.4 y 8.0 kb. El análisis de estos productos de digestión por la técnica de Southern muestra hibridación con las bandas de 6.2 y 8.0 kb. *Bam*HI digiere la misma molécula en fragmentos de 6.0, 10.1 y 12.9, y la hibridación se encuentra asociada a los fragmentos de 6.0 y 10.1 kb. Cuando se corta conjuntamente con *Eco*RI y *Bam*HI, se producen fragmentos de 1.0, 2.0, 2.9, 3.5, 6.0, 6.2 y 7.4 kb.

a. Dibuje un mapa de restricción de esta molécula, indicando las posiciones relativas y las distancias.

b. Se añade una sonda radiactiva obtenida a partir del gen *X* del fago a filtros donde previamente se ha transferido DNA del fago digerido con una sola enzima. Los autorradiogramas muestran hibridación con los fragmentos de 4.5, 10.1 y 12.9 kb. Dibuje la localización aproximada del gen *X* en el mapa de restricción.

(El problema 15 es cortesía de Joan McPherson. De A. J. F. Griffiths y J. McPherson, *100+ Principles of Genetics*, W. H. Freeman and Company, 1989).

16. Se ha aislado un clon de cDNA y un clon genómico para una fosfatasa. A partir de los siguientes datos, se pueden determinar las características estructurales del gen y su transcrito.

Mapa del cDNA

El fragmento de cDNA se escindió de un plásmido y se marcó en sus extremos con ^{32}P.

Digestión conjunta con HaeIII y TaqI

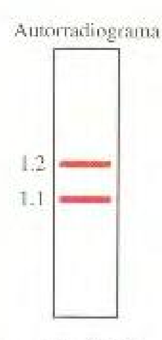
Fragmentos electroforéticos teñidos con bromuro de etidio



Autorradiograma del gel anterior:



Digestión sólo con TaqI

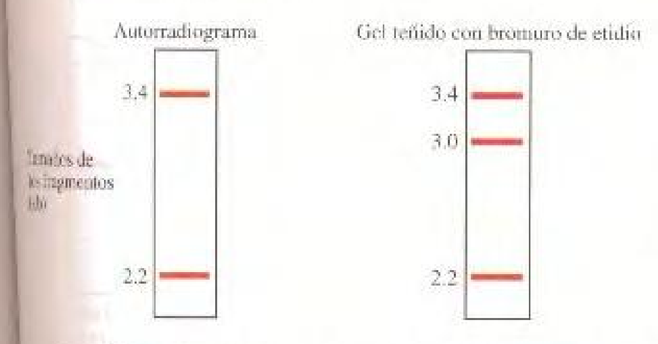


a. Determine el mapa del cDNA.

Mapa del DNA genómico

El fragmento de DNA genómico contenido en un clon del fago λ se digirió con *Eco*RI y se determinaron sus características. Se marcó el fragmento en ambos extremos y se digirió.

Digestión completa con BamHI



b. Dibuje el mapa genómico, indicando los sitios de restricción.

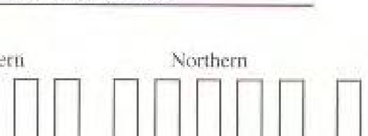
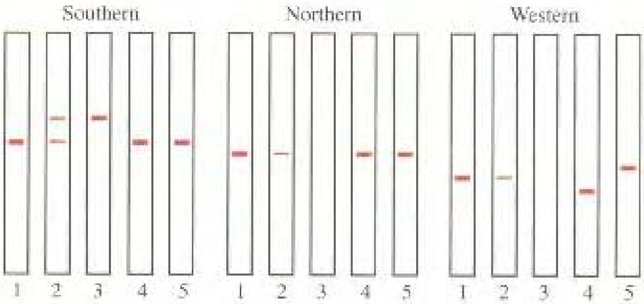
c. Una sonda marcada del cDNA hibridó con los fragmentos genómicos de 3.4 y 2.2 kb. El fragmento *Taq*I de 1.2 kb hibridó con el fragmento genómico de 3.4 kb. Si el gen de la fosfatasa fuera un gen de copia única, ¿con qué fragmentos genómicos hibridaría el fragmento *Taq*I de 1.1 kb?

d. ¿Qué parte del gen representa el fragmento genómico de 3.0 kb?

(El problema 16 es cortesía de Joan McPherson. De A. J. F. Griffiths y J. McPherson, *100+ Principles of Genetics*. W. H. Freeman and Company, 1989).

17. El interferón α está determinado por un gen que carece de intrones. El fragmento *Bam*HI que contiene el gen completo puede detectarse mediante la técnica de Southern, hibridándolo con una sonda de cDNA del interferón marcada con ^{32}P que, en las condiciones de hibridación utilizadas, detecta sólo secuencias del interferón.

Para determinar la causa de ciertas inmunodeficiencias, se ha analizado el gen del interferón α y su expresión a partir de muestras de sangre procedentes de individuos afectados y de individuos sanos. El siguiente diagrama representa los autorradiogramas obtenidos mediante las técnicas de Southern y Northern, y la técnica de Western en la que se utilizó como sonda un anticuerpo específico para el interferón α. Los individuos 1 y 2 presentan una capacidad inmune normal; los individuos 3, 4 y 5 son inmunodeficientes.

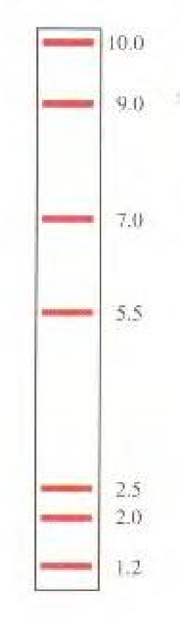
a. ¿Qué individuos son homocigóticos para el gen del interferón α?

b. ¿Cuáles cree que son las causas de las inmunodeficiencias en los individuos 3, 4 y 5? Describa el tipo de mutación sufrido por cada persona.

(El problema 17 es cortesía de Joan McPherson. De A. J. F. Griffiths y J. McPherson, *100+ Principles of Genetics*. W. H. Freeman and Company, 1989.)

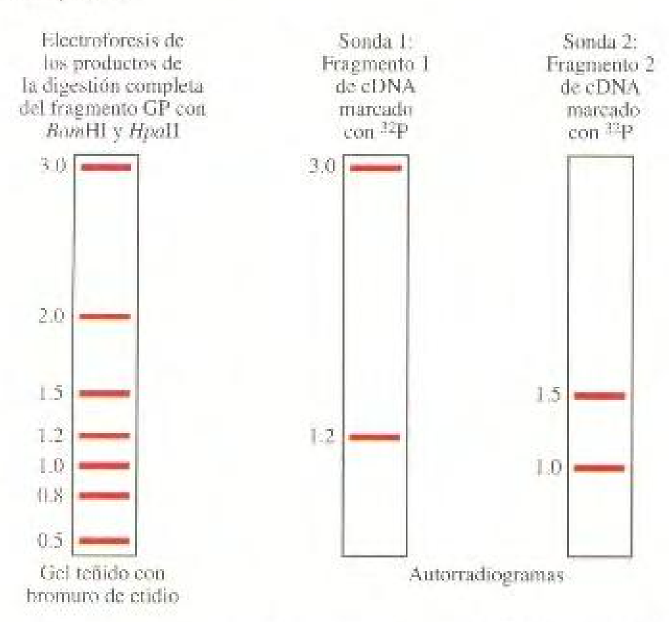
18. Un fragmento de DNA genómico humano que contiene el gen *P* se escinde de un vector de λ utilizando *Hin*dIII, y los extremos del fragmento génico (GP) se marcan con ^{32}P. Inicialmente, se digiere el fragmento con *Bam*HI, que produce un fragmento de 1.0 kb y otro de 10 kb. Tras digestión *parcial* del fragmento de 10 kb con *Hpa*II, se separan los productos por electroforesis, y se obtienen los siguientes resultados:

Autorradiograma de la digestión con *Hpa*II del fragmento GP



a. Elabore un mapa del fragmento genómico, indicando la posición de los sitios *Bam*HI y *Hpa*II.

La digestión del cDNA del gen *P* con *Hpa*II genera sólo dos fragmentos. Se marcan ambos, y cada uno se utiliza como sonda en un análisis por la técnica de Southern de los fragmentos obtenidos tras digerir completamente el fragmento GP con *Hpa*II y *Bam*HI.



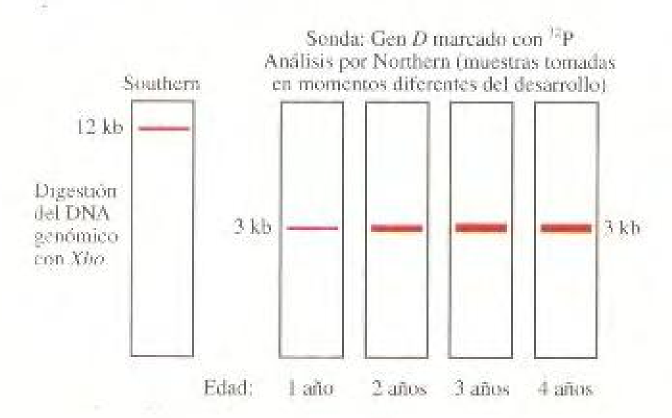
b. Dibuje un diagrama comparativo del DNA genómico y el cDNA. Indique los sitios de restricción. Explique las diferencias.

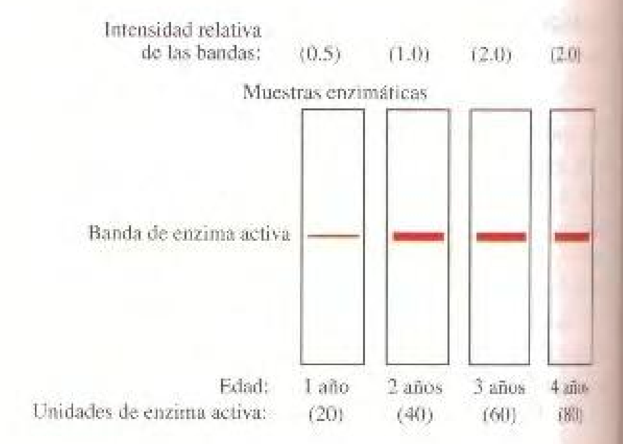
c. Marque el sitio *Hpa*II en el cDNA e indique la orientación de los fragmentos *Hpa*.

(El problema 18 es cortesía de Joan McPherson. De A. J. F. Griffiths y J. McPherson, *100+ Principles of Genetics*, W. H. Freeman and Company, 1989.)

19. En dos niños, se analiza la expresión del gen (*D*) que determina una enzima importante para el desarrollo del músculo. Los resultados del estudio del gen y su producto se muestran a continuación.

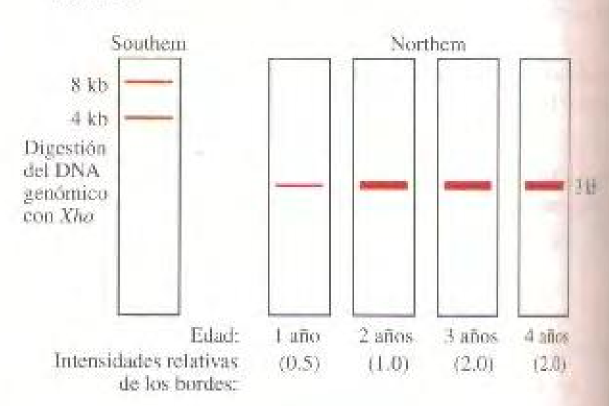
Niño 1

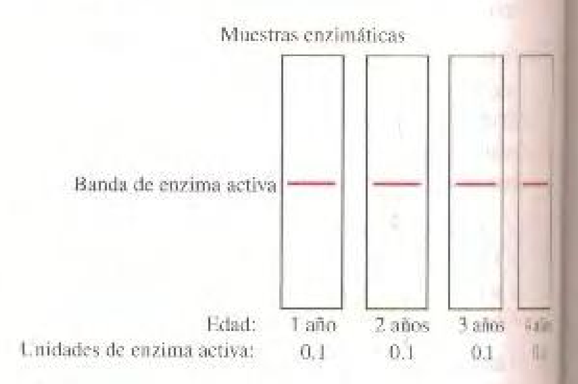




En el caso del segundo niño, la actividad enzimática resultó ser muy baja, en torno a 0.1 unidades a las edades de 1, 2, 3 y 4 años.

Niño 2





a. Para ambos niños, dibuje un esquema que represente el patrón de expresión del gen durante el desarrollo. (Indique con claridad qué se representa en cada eje.)

b. ¿Cómo explicaría los bajos niveles de enzima activa en el niño 2? (La inestabilidad de la proteína es sólo una de las posibles causas.)

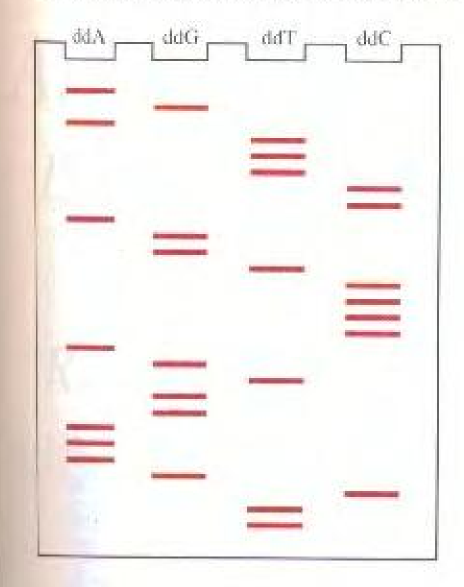
c. ¿Cómo explicaría las diferencias entre ambos niños en los resultados del análisis mediante la técnica de Southern?

d. Si sólo se ha detectado un alelo mutante en los est

dios de las familias de los dos niños, indique para cada uno de los niños si considera que es homocigótico o heterocigótico para el gen *D*.

(El problema 19 es cortesía de Joan McPherson. De A. J. F. Griffiths y J. McPherson, *100+ Principles of Genetics*, W. H. Freeman and Company, 1989.)

20. Se ha secuenciado por el método de los didesoxinucleótidos un fragmento de DNA clonado. Se muestra una parte del autorradiograma del gel de secuenciación.



a. Deduzca la secuencia de la cadena de DNA sintetizada a partir del cebador, indique los extremos 5′ y 3′.

b. Deduzca la secuencia nucleotídica de la cadena de DNA utilizada como molde, indique los extremos 5′ y 3′.

c. Escriba la secuencia nucleotídica de la cadena doble de DNA (marque los extremos 5′ y 3′).

d. ¿Cuántas de las seis posibles pautas de lectura darían lugar a tramos «abiertos» considerando la información de que dispone?

21. El clon de cDNA correspondiente al gen humano que determina la tirosinasa se ha utilizado en un análisis mediante la técnica de Southern del DNA genómico de un ratón silvestre digerido con *Eco*RI. Se observó hibridación de la sonda con tres fragmentos. Cuando se utilizó el DNA genómico de ratones albinos en un análisis similar no se observó hibridación con la sonda. Explique estos resultados en relación con la naturaleza de los alelos silvestre y mutante del ratón.

22. La proteína determinada por el gen de la alcaptonuria tiene 445 aminoácidos y, sin embargo, el gen abarca 60 kb (véase el apartado «Un siglo de investigación genética sobre la alcaptonuria»). ¿Cómo es posible?

13

APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE



Planta de tabaco transgénica que expresa el gen de la luciferasa de luciérnaga.
(Keith Wood, Promega, Madison, WI.)

Ideas fundamentales

La mutagénesis *in vitro* permite realizar cambios muy específicos en posiciones concretas de un gen.

En los cromosomas de un organismo individual, la presencia o ausencia de dianas de restricción en posiciones concretas genera polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Los RFLP pueden utilizarse como marcadores en la cartografía genética, así como en el diagnóstico de genes ligados causantes de enfermedades.

La Genética inversa funciona en una dirección opuesta a la de la Genética clásica, permitiendo que a partir de una secuencia de DNA o de proteína cuya función se desconoce pueda identificarse su función biológica mediante análisis fenotípico.

Un gen cuyo producto sea fácilmente detectable puede colocarse bajo el control de las regiones reguladoras de otro gen y, de este modo, actuar como testigo de la expresión de ese gen.

La tecnología del DNA recombinante puede utilizarse para producir microorganismos, plantas y animales portadores de genes de otras especies.

La tecnología del DNA recombinante también tiene aplicación en el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas humanas.

En el capítulo anterior, analizamos las técnicas básicas para la utilización de la tecnología del DNA recombinante en el aislamiento y caracterización de genes. En este capítulo, ampliaremos el análisis para mostrar el amplio abanico de posibilidades experimentales que nos proporciona el disponer de un clon de DNA de un gen aislado. Por ejemplo, podemos mutar un gen clonado de forma muy específica en el tubo de ensayo y reintroducirlo en el organismo hospedador original para estudiar su función normal. En principio, este procedimiento se asemeja bastante al que se sigue habitualmente para la disección genética de un proceso. Sin embargo, en el caso de las mutaciones espontáneas inducidas, la naturaleza de los cambios producidos en el DNA es en gran medida impredecible, y las mutaciones pueden estar localizadas casi en cualquier parte del gen. Por el contrario, la mutagénesis *in vitro* permite la introducción de mutaciones específicas en sitios concretos de un gen, y esto la convierte en una estrategia de gran aplicación en el estudio de la función génica.

Mediante la combinación de las técnicas de clonación de DNA y de análisis con enzimas de restricción se ha desarrollado un nuevo método de gran utilidad que se emplea para la elaboración de mapas genéticos. Este método se basa en que la variación de los sitios de restricción dentro de una especie proporciona un número elevado de «alelos» moleculares o **marcadores moleculares** para la cartografía cromosómica. La detección de estos marcadores se lleva a cabo utilizando fragmentos clonados de DNA como sondas. La posibilidad de detectar un número elevado de estos marcadores moleculares ha supuesto una revolución para la cartografía genética en la mayoría de los organismos, incluidos los seres humanos.

Los genes clonados (silvestres o mutantes) también pueden ser transferidos a un organismo hospedador diferente para producir microorganismos, plantas o animales transgénicos, cuya creación no habría sido posible mediante técnicas clásicas de mejora genética. Esta técnica no sólo tiene utilidad en el área de la investigación básica, sino que además encuentra una gran variedad de aplicaciones en las áreas de mejora animal y vegetal, microbiología industrial y medicina.

La posibilidad de utilizar genes clonados como sondas también establece nuevas fronteras en el diagnóstico de las enfermedades genéticas humanas, aplicable tanto a individuos que deseen ser padres como a fetos *in* útero.

En primer lugar, examinaremos algunas estrategias para la introducción *in vitro* de mutaciones específicas en genes clonados: en otras palabras, estudiaremos cómo se construyen «genes de diseño».

Mutagénesis *in vitro*

Una de las técnicas mejor establecidas es la **mutagénesis dirigida**. Utilizando este método, podemos generar mutaciones en cualquier posición de un gen de secuencia conocida. A partir de la secuencia, se sintetizan químicamente segmentos cortos de DNA denominados **oligonucleótidos**, correspondientes a cualquier sitio escogido del gen, al que pueden unirse mediante la hibridación entre cadenas sencillas de DNA. En una de las estrategias, el gen de interés se inserta en un vector de DNA de cadena sencilla, como el fago M13. Se diseña un oligonucleótido portador de la mutación deseada y se permite que hibride con la región complementaria del DNA clonado. El oligonucleótido actúa como cebador para la síntesis *in vitro* de la cadena complementaria insertada en el vector M13 (Fig. 13-1*a*). El cambio de base que deseamos generar se programa en la secuencia del cebador sintético. A pesar de que las bases mutadas están mal emparejadas, la hibridación del oligonucleótido sintético con el DNA complementario se produce si se realiza a baja temperatura y con concentraciones elevadas de sal. Una vez que la polimerasa del DNA completa la síntesis *in vitro*, se deja replicar el DNA de M13 en *E. coli*, obteniéndose así un gran número de fagos portadores de la mutación deseada. Para distinguir entre los fagos silvestres y los mutantes se puede utilizar el oligonucleótido marcado como sonda. A temperatura baja, la base mal emparejada no impide que el cebador hibride con ambos tipos de fagos; sin embargo a temperatura elevada, el cebador sólo hibridará con el fago mutante. También pueden generarse deleciones o inserciones en el gen de interés incorporando este tipo de cambios en los oligonucleótidos. La estrategia descrita no sólo es aplicable a genes clonados en vectores como el fago M13, sino que también puede utilizarse con vectores de DNA de doble cadena, siempre y cuando el DNA se desnaturalice antes.

El conocimiento de los sitios de restricción también resulta útil para modificar un gen clonado. Por ejemplo, se puede generar una pequeña deleción si se elimina el fragmento que se libera cuando se corta el DNA con dos enzimas de restricción (Fig. 13-1*b*). Utilizando este mismo tipo de digestión doble, puede insertarse un fragmento de DNA en un sitio de corte para generar así una duplicación u otra modificación (Fig. 13-1*c*). Otra estrategia consiste en recortar con una exonulcasa uno de los extremos generados por digestión con una enzima de restricción para generar deleciones de longitud variable (Fig. 13-1*d*).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) puede utilizarse también para generar mutaciones (Fig. 13-1*e*). En una primera ronda de PCR, se utiliza un cebador portador de la mutación deseada. El producto de esta reacción se emplea como cebador en una segunda ronda de PCR, cuyo producto es el alelo mutante.

COROLARIO

Las técnicas de mutagénesis dirigida permiten la incorporación de cambios específicos en sitios concretos de un gen.

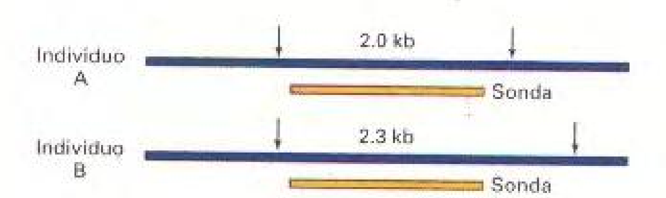
Cartografía por RFLP

En el Capítulo 12, vimos que si un fragmento clonado de DNA se utiliza como sonda en el análisis de un DNA genómico que haya sido cortado con una enzima de restricción, la sonda se unirá a uno o varios fragmentos genómicos. Por ejemplo, si la enzima de restricción utilizada no corta dentro de la región cromosómica correspondiente al fragmento clonado, la sonda

(a) Mutagénesis dirigida utilizando oligonucleótidos
(i) Sustitución de un par de bases
Unión del oligo al ssDNA
Polimerización
Replicación en la célula
Oligo
ssDNA
C A C A C G Sitio mutante y T A
(ii) Inserción
Inserto y
(iii) Deleción
Deleción y
(b) Intercambio de fragmentos
RE
Sitio mutante
(c) Deleción
RE
Deleción
(d) Conjunto de deleciones
Bloqueado químicamente
Digestión con exonucleasa
Deleción
(e) Mutagénesis por PCR
• 1ª PCR para obtener un cebador largo
Producto
• 2ª PCR utilizando el cebador largo
Producto

Figura 13-1. Mutagénesis *in vitro*. (Oligo, oligonucleótido; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; RE, enzima de restricción; ssDNA, DNA de cadena sencilla.)

ría un solo fragmento delimitado por un sitio de restricción a cada lado. Puesto que el DNA cromosómico de los individuos de una especie suele ser homólogo, cabría esperar que el tamaño de los fragmentos detectados por la sonda fuera el mismo en todos los individuos. Sin embargo, los fragmentos a los que se unen las sondas suelen ser de tamaños diferentes en distintos individuos. Esto se explica porque una diana de restricción determinada no está siempre presente en todos los individuos. La ausencia de una diana de restricción se debe normalmente a una sola diferencia nucleotídica que suele ser biológicamente neutra. Así, por ejemplo, si una sonda se une a un fragmento de 2 kb en el individuo A de una especie haploide y a un fragmento de 2.3 kb en el individuo B, el motivo suele ser que una de las dianas que delimitaban el fragmento de 2 kb ha desaparecido en el individuo B, y la siguiente diana se localiza a 0.3 kb de distancia, por lo que el fragmento resultante mide 2.3 kb.



La presencia y la ausencia de una diana de restricción es equiparable a la existencia de dos alelos, que podemos designar con los signos + y −. La presencia del alelo + en algunos individuos de la población y su ausencia (−) en otros genera un **polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, o RFLP** (del inglés *restriction fragment length polymorfism*). El ejemplo discutido se consideraría un dimorfismo, por la presencia de dos «morfos», uno corto y uno largo. Los genetistas se sorprendieron al descubrir que los RFLP son bastante comunes en una pobla-

ción y que casi podían detectar uno con cada sonda diferente. Los RFLP se identifican siguiendo un método de prueba y error que consiste en hibridar una serie de fragmentos genómicos clonados aleatoriamente con fragmentos de restricción genómicos de diferentes individuos de una familia o de una población. Debido a que los RFLP son un tipo de variación natural relativamente frecuente, este método es muy efectivo para encontrar RFLP.

Los RFLP son importantes por tres razones. En primer lugar, si un individuo es heterocigótico para dos morfos de un RFLP, este «locus» puede utilizarse como marcador en la cartografía de cromosomas. Aunque al principio puede que no se conozca la localización del RFLP, a medida que se identifican más y más RFLP, puede determinarse su posición en relación con otros RFLP o con otros loci génicos, y así se satura progresivamente el mapa genético. En la mayoría de los casos, los RFLP no tienen importancia biológica, pero son muy útiles para localizar genes interesantes y sirven como puntos de referencia para la clonación posicional de genes.

En segundo lugar, y como uso añadido de la cartografía genética, los diferentes alelos (morfos) de un RFLP pueden utilizarse con fines diagnósticos. Por ejemplo, imaginemos que en una familia con un historial de padecer una enfermedad determinada se encuentra una correlación entre los individuos afectados por la enfermedad y la presencia de un alelo concreto de un RFLP. En este caso, puede considerarse que este RFLP no sólo está ligado al locus génico de la enfermedad, sino que además el alelo concreto de ese RFLP se encuentra en configuración *cis* respecto al alelo de la enfermedad. De este modo, el alelo del RFLP se convierte en marcador para el diagnóstico, proporcionando una información muy útil para el consejo genético.

En tercer lugar, los RFLP pueden utilizarse para medir la divergencia genética entre poblaciones diferentes o especies relacionadas. Las diferencias en las dianas de restricción reflejan diferencias en la secuencia del DNA, de manera que la medida del número total de diferencias en los RFLP representa una medida de la divergencia genética. Por ello, los RFLP son importantes en los estudios evolutivos.

Los mapas de RFLP suelen establecerse a partir de un conjunto definido de estirpes o de individuos de una especie que se convierten en «tipo» o referencia para la cartografía en esas especies. Por ejemplo, en el hongo *Neurospora*, se sabe que dos estirpes silvestres, Oak Ridge y Mauriceville, presentan muchas diferencias en los RFLP, por lo que estas estirpes sirven de referencia para la cartografía de RFLP en el hongo. La posición de los RFLP puede determinarse en relación con otros RFLP o con genes de expresión fenotípica conocida. Por ejemplo, supongamos que *ad* representa un alelo que confiere auxotrofía para adenina, y 1 y 2 representan RFLP con «alelos» diferentes en la estirpe Oak Ridge (OR) y Mauriceville (M). Se puede realizar un cruzamiento $ad \cdot 1^{OR} \cdot 2^{OR} \times ad^{+} \cdot 1^{M} \cdot 2^{M}$ y analizar los tres loci en la descendencia. La auxotrofía para adenina se determina inoculando las estirpes en medio sin adenina y los RFLP se analizan mediante hibridación con las sondas adecuadas. Las frecuencias de recombinación se calculan por el método habitual. La mayoría de los mutantes de *Neurospora* se han obtenido a



Figura 13-2. Cartografía de un gen (*m*) de *Neurospora* mediante análisis de RFLP. Las dos estirpes parentales muestran varios RFLP a lo largo de los cromosomas; los loci correspondientes aparecen numerados del 1 al 5. Las dos estirpes parentales proceden de Oak Ridge (Tennessee) y Mauriceville (Texas), y los alelos de RFLP correspondientes se han designado O y M, respectivamente. Se observan muchos tipos diferentes de descendientes, aunque sólo se muestran los más comunes. Los resultados indican que el alelo + siempre segrega con el 4^{M}, y que el alelo *m* siempre segrega con 4°, lo que sugiere el ligamiento entre *m* y el locus 4 de RFLP.

partir de la estirpe silvestre Oak Ridge, así que resulta relativamente fácil establecer relaciones de ligamiento entre los alelos mutantes y los RFLP simplemente cruzando la estirpe Oak Ridge mutante con la estirpe silvestre Mauriceville. En la Figura 13-2 se muestra un ejemplo de cartografía genética de un mutante con fenotipo asociado, utilizando RFLP como marcadores.

En otros organismos también se han establecido estirpes tipo. Para la cartografía del genoma humano, por ejemplo, se ha utilizado una estrategia similar. Se ha aislado el DNA de un grupo definido de individuos pertenecientes a 61 familias con un promedio de 8 hijos cada una, y este DNA se ha puesto a libre disposición para que cualquier laboratorio lo utilice como referencia para la cartografía basada en los RFLP.

La Figura 13-3 muestra un ejemplo de análisis de ligamiento entre el alelo responsable de una enfermedad y un RFLP, y se

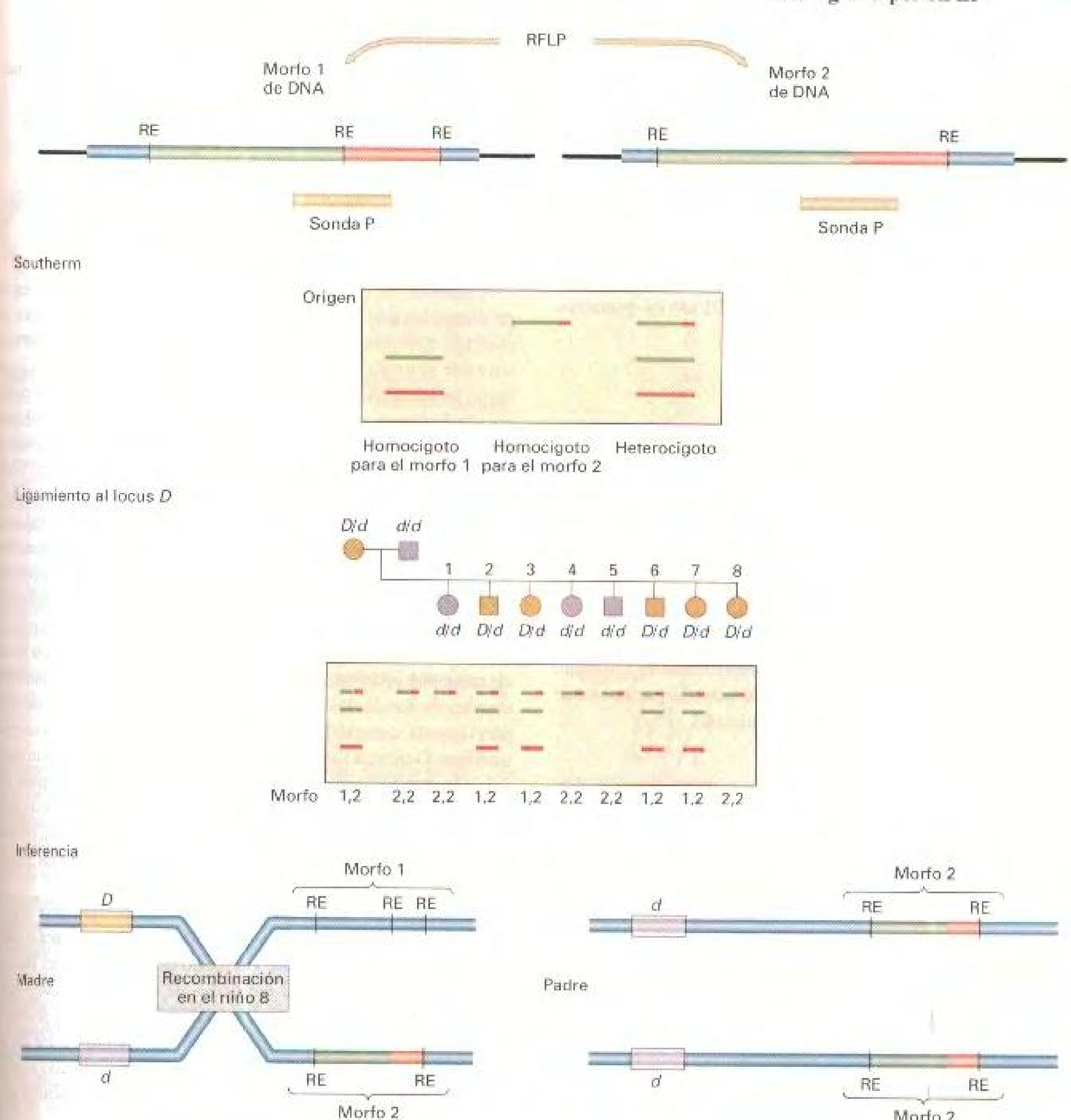


Figura 13-3. Detección y transmisión de un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Una sonda P detecta 2 morfos de DNA cuando el DNA se corta con una enzima de restricción determinada (RE). El pedigrí del fenotipo dominante D, que se manifiesta en una enfermedad, sugiere ligamiento entre el locus *D* y el locus del RFLP; sólo el niño 8 es recombinante.

utilidad en el diagnóstico de la enfermedad. Debido al alto grado de ligamiento, podemos predecir que las generaciones futuras de individuos que presenten el morfo 1 del RFLP tienen una probabilidad elevada de heredar el alelo *D* responsable de la enfermedad. Este tipo de poder predictivo puede utilizarse en el diagnóstico prenatal del genotipo fetal, a partir de muestras de líquido amniótico o de vellosidades coriónicas (como trataremos más adelante en este capítulo).

COROLARIO

Los RFLP constituyen marcadores moleculares útiles para la cartografía de los cromosomas y para el diagnóstico de los alelos responsables de enfermedades humanas.

Merece la pena comparar el proceso de elaboración de mapas de restricción (*Localización de genes en mapas de restricción*, págs. 390-392) con el de la *cartografía por RFLP*. Los mapas de

restricción se basan en el análisis *físico* del DNA, mientras que los mapas de RFLP se basan en el análisis de la *recombinación* en cruzamientos. Observe que los mapas físicos se basan en dianas de restricción invariables, mientras que los mapas de RFLP se basan en la variación de dianas de restricción entre cromosomas homólogos. La mayoría de los mapas de restricción son mapas a pequeña escala (y alta resolución), aunque pueden construirse mapas a mayor escala utilizando enzimas que cortan con baja frecuencia. Por el contrario, los mapas de RFLP suelen ser a gran escala (y menor resolución). En el Capítulo 14 se discutirá con amplitud la elaboración de mapas de RFLP en genomas completos.

Genética inversa

La Genética clásica parte, como ya hemos visto, de un fenotipo mutante, prosigue con la demostración de la existencia del gen correspondiente mediante el análisis de segregaciones fenotípicas en la descendencia, y termina con la clonación y secuenciación del gen, que también nos permite determinar la secuencia de la proteína cifrada. Sin embargo, la **Genética inversa**, una nueva estrategia derivada de la tecnología del DNA recombinante, funciona en el sentido contrario. La Genética inversa parte de una proteína o DNA para los cuales no disponemos de información genética y actúa en sentido opuesto al habitual para generar un alelo mutante y el fenotipo correspondiente.

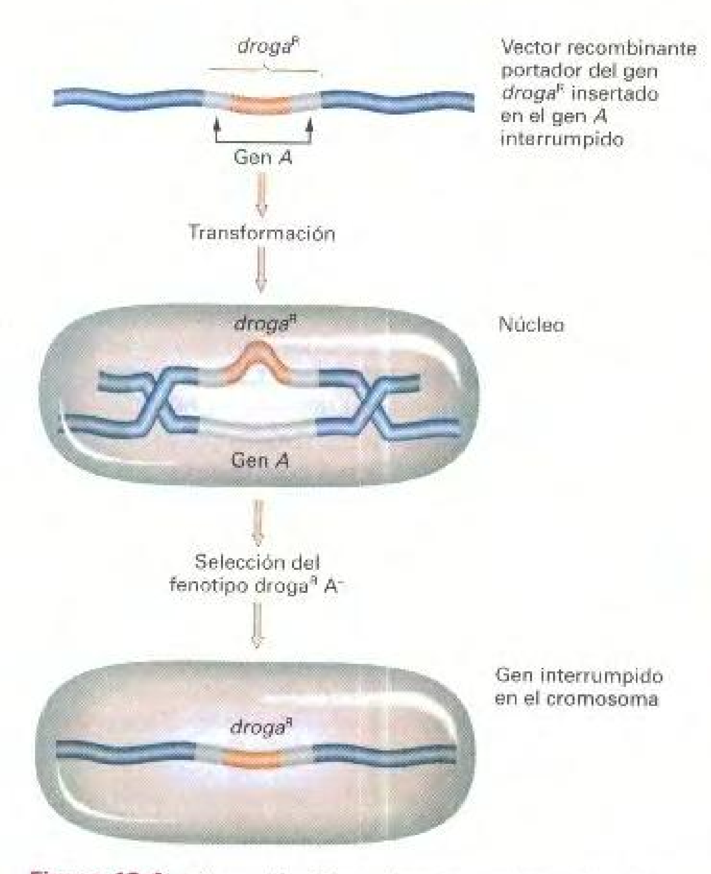
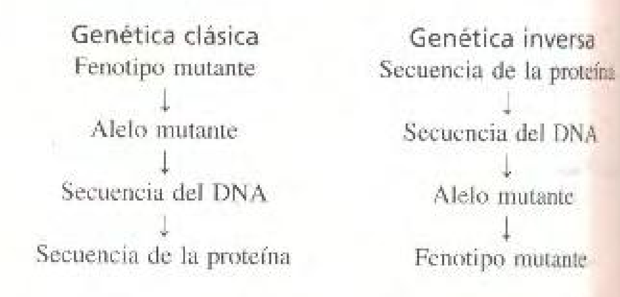


Figura 13-4. Interrupción génica mediante integración homóloga de una secuencia que contiene un marcador seleccionable.



A menudo, el punto de partida de la Genética inversa es una proteína o un gen «en busca de función», o en otras palabras, una proteína o un gen «en busca de fenotipo». Por ejemplo, un alelo silvestre clonado que haya sido identificado por secuenciación como una secuencia de lectura abierta (ORF) de función desconocida puede mutagenizarse *in vitro* y reintroducirse en el organismo de origen para determinar el fenotipo resultante. Si de lo que disponemos es una proteína de función desconocida, podemos deducir la secuencia del DNA a partir de la de la proteína y sintetizar este DNA *in vitro*. El DNA puede entonces utilizarse como sonda para buscar el gen completo, clonarlo y someterlo a mutagénesis *in vitro*, y así determinar el efecto fenotípico correspondiente. Esta estrategia está ganando cada vez más relevancia a medida que se van acumulando datos de los proyectos de secuenciación de genomas completos. Los proyectos de secuenciación están identificando numerosos ORF desconocidos, muchos de los cuales no guardan similitud con ningún otro gen previamente caracterizado, y cuya función podemos averiguar mediante Genética inversa. Este tipo de análisis ya se ha iniciado con *Saccharomyces cerevisiae*; la secuenciación completa del genoma de este organismo ha identificado muchos ORF sin asignar, que están siendo mutados sistemáticamente para obtener alelos nulos en busca de un fenotipo que pueda aportar alguna pista sobre su función.

Además de la mutagénesis *in vitro*, otra herramienta importante para la Genética inversa es la **interrupción génica** o **inactivación dirigida de un gen**. Un modo de conseguirla es insertar un marcador seleccionable en medio de un gen clonado y utilizarlo para transformar una estirpe silvestre. Mediante selección del marcador se obtienen algunos transformantes en los que la versión interrumpida del gen (mutante) ha reemplazado a la silvestre (Fig. 13-4). Volveremos a las interrupciones génicas más adelante en este capítulo

COROLARIO

La Genética inversa identifica la función normal de secuencias de DNA o de proteínas de función desconocida mediante la mutación de la secuencia *in vitro* y el análisis de los cambios fenotípicos provocados por dicha mutación.

Expresión de genes eucarióticos en bacterias

En el Capítulo 12, vimos que cualquier gen eucariótico puede clonarse en un vector de expresión de *E coli*. Utilizamos el término **transgénico** para referirnos a un organismo en el que se ha introducido un gen foráneo o **transgén**. Así, las bacterias que

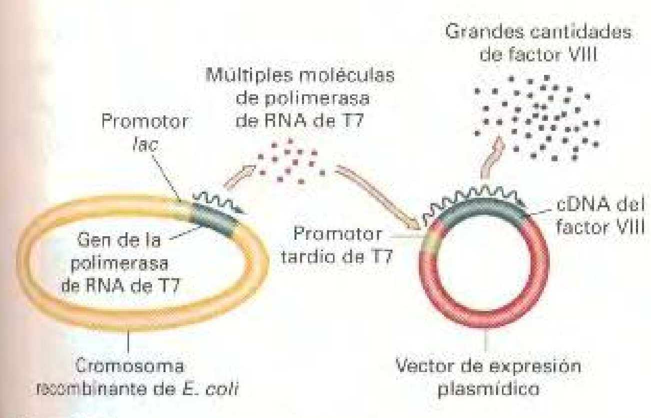


Figura 13-5. Sistema de expresión en dos etapas basado en la polimerasa de RNA del bacteriófago T7 y los promotores tardíos que reconoce. El cromosoma de una célula de *E. coli* modificada genéticamente contiene una copia del gen de la polimerasa de RNA de T7 bajo el control del promotor del gen *lac*. Cuando se induce la actividad de dicho promotor por adición de IPTG, se transcribe el gen de la polimerasa de RNA de T7 y el mRNA se traduce en la enzima correspondiente. La polimerasa inicia la transcripción a tasas elevadas del gen situado bajo el control de un promotor tardío de T7 en el vector de expresión. Aunque en la figura sólo se ha representado una copia del vector, éste se encuentra en gran número de copias dentro de las células. La gran cantidad de mRNA que se transcribe a partir del cDNA clonado a continuación del promotor tardío de T7 da lugar a grandes cantidades del producto proteico correspondiente. (Adaptado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)

contienen genes eucarióticos son bacterias transgénicas. Los cultivos de estas bacterias transgénicas pueden utilzarse como «fábricas» para la síntesis de proteínas eucarióticas de interés, que serían difíciles de obtener por otros medios. En sentido amplio, el término **Biotecnología** define esta área de investigación que consiste en la aplicación de la tecnología del DNA recombinante con fines comerciales. Cada vez se extiende más el uso de «organismos de diseño» patentados, tanto eucarióticos como procarióticos, y es muy probable que la Biotecnología no tarde en convertirse en un sector dominante de la economía del siglo XXI.

Cuando se emplean bacterias para producir proteínas eucarióticas, conviene diseñar un sistema que permita obtener la proteína de interés en la mayor cantidad posible. En *E. coli*, disponemos de varios sistemas adecuados para la sobreproducción de proteínas foráneas. Uno de los sistemas se basa en la utilización de la polimerasa de RNA del fago T7 y de un promotor reconocido por dicha polimerasa. En las fases tardías de su ciclo de infección, el fago T7 sintetiza cantidades enormes de productos génicos situados bajo el control de los denominados *promotores tardíos*. De hecho, en esta fase del ciclo, los genes de la bacteria hospedadora ya no se expresan y las proteínas virales tardías son los únicos productos que se sintetizan. La Figura 13-5 muestra los dos componentes de este sistema. El primer componente consiste en el gen de la polimerasa de RNA de T7 situado bajo el control del promotor *lac*, cuya transcripción está regulada negativamente por el represor *lac* (Capítulo 11). Cuando se añade el análogo de la lactosa IPTG (isopropil β-D-tiogalactósido), el represor se inactiva y se sintetiza la polimerasa de RNA de T7 en grandes cantidades. El segundo componente del sistema consiste

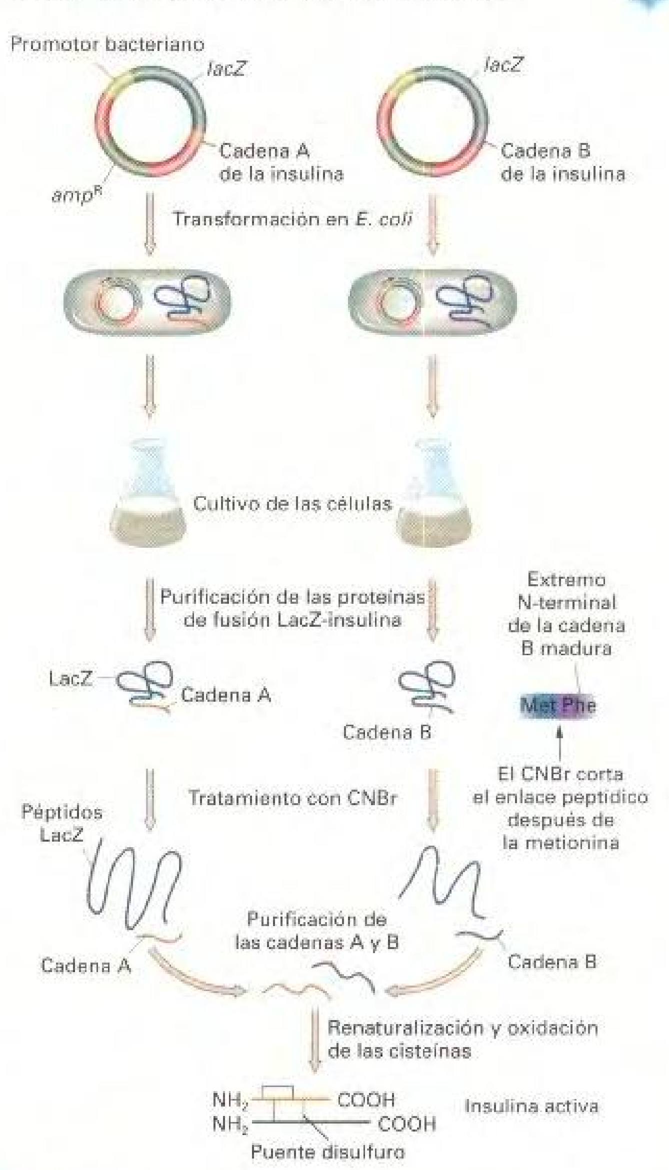


Figura 13-6. Expresión de la insulina humana en *E. coli*. Las dos cadenas de la insulina se producen por separado, en forma de proteínas de fusión a la β-galactosidasa. Posteriormente se procesan químicamente y se reúnen para formar insulina activa. (Copyright © 1992 de James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski y Mark Zoller. *Recombinant DNA*, 2.ª ed Copyright © Scientific American Books.)

en el cDNA del gen de interés (en el ejemplo, el factor VIII de coagulación humano, del que carecen los hemofílicos) insertado a continuación de un promotor tardío de T7. La polimerasa de RNA de T7 reconoce específicamente este promotor y transcribe el gen a niveles elevados, dando lugar a la síntesis de grandes cantidades de factor VIII en la bacteria.

Actualmente, muchas proteínas como la insulina humana (Fig. 13-6), la hormona del crecimiento humana (Fig. 13-7) y una amplia gama de fármacos, se producen utilizando bacterias y hongos modificados genéticamente. La Figura 13-8 muestra un ejemplo de una bacteria cuya modificación genética resulta en la síntesis de un compuesto que confiere una coloración diferente a las colonias.

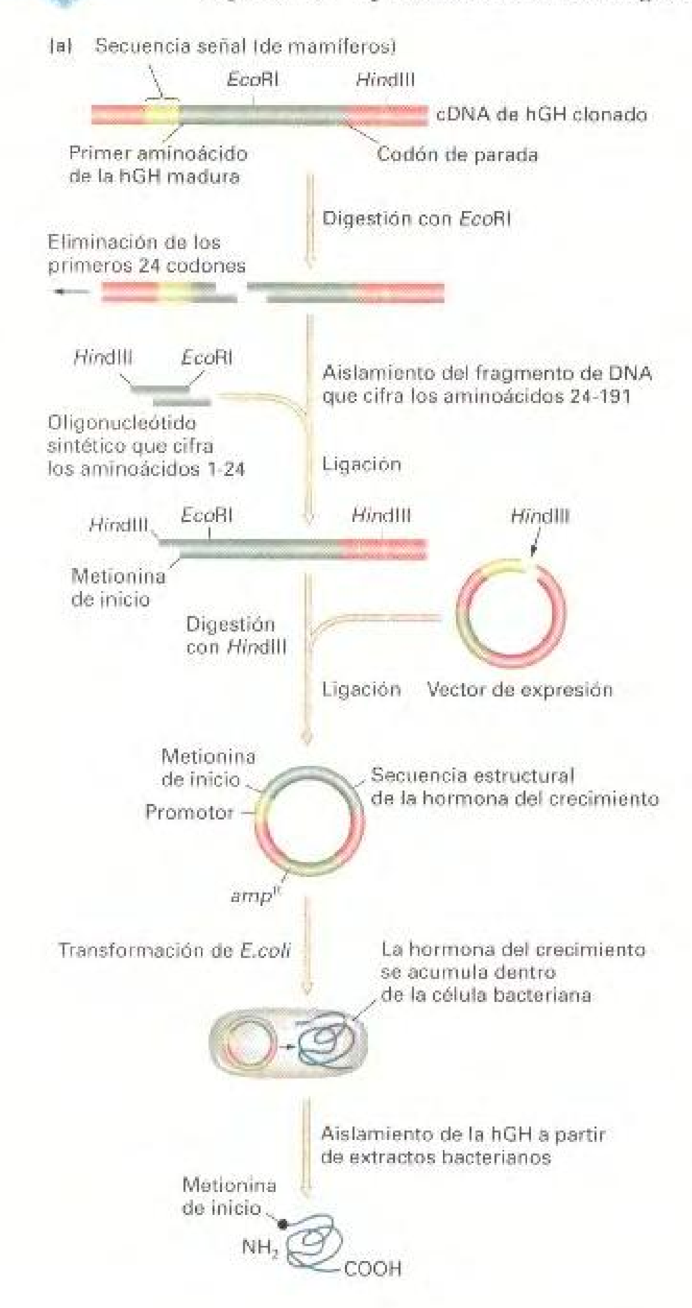




Figura 13-7. Expresión de la hormona del crecimiento humana (hGH) en *E. coli*. (a) Se elimina la secuencia señal para permitir que la proteína se exprese en bacterias. El producto contiene una metionina extra. (b) Alternativamente, puede añadirse una secuencia señal bacteriana que determina la secreción de la proteína. En este caso, el producto no contiene la metionina extra. (Copyright © 1992 de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller. *Recombinant DNA*, 2.ª ed Copyright © Scientific American Books.)

La tecnología del DNA recombinante en eucariotas

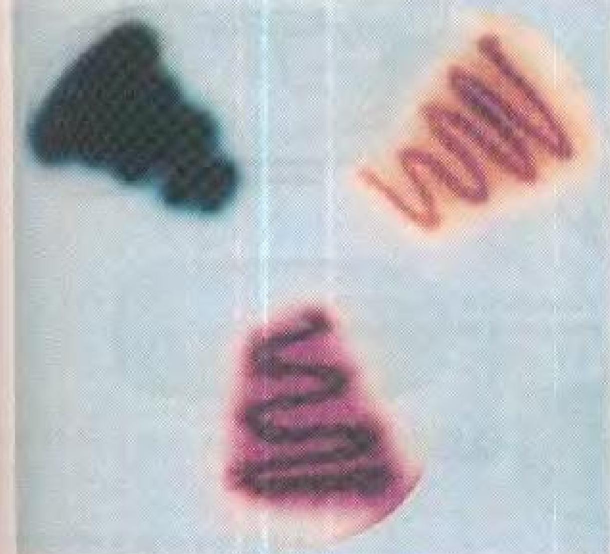
Aunque las técnicas de manipulación y clonación genética se pusieron a punto en bacterias, actualmente se utilizan de forma rutinaria en varios organismos modelo eucarióticos. Los genomas de los eucariotas son mayores y más complejos que los de las bacterias, de manera que es necesario adaptar las técnicas para poder manejar la mayor cantidad de DNA y la diversidad de tipos celulares y ciclos de vida eucarióticos. Por ejemplo, algunas proteínas eucarióticas no pueden producirse en grandes cantidades en las bacterias, sino que se necesita utilizar un sistema de expresión eucariótico. Un vector de expresión de este tipo, ampliamente utilizado, es el baculovirus de insectos, en el cual se inserta el gen de interés para expresarlo en grandes cantidades en cultivos celulares (Fig. 13-9). Aunque los genes eucarióticos se clonan y secuencian en hospedadores bacterianos, es habitual que deseemos reintroducir dichos genes en el organismo eucariótico original o en otro y así generar un eucariota transgénico.

Eucariotas transgénicos

Se puede introducir DNA en una célula eucariótica mediante técnicas diversas, como la transformación, la inyección, la infección viral o el bombardeo de partículas de tungsteno recubiertas de DNA (Fig. 13-10). Como vimos en el Capítulo 12, cuando se añade exógenamente DNA al organismo de origen, la inserción de este DNA puede ocurrir ectópicamente o bien reemplazando al gen residente. Si el DNA es un transgén procedente de otra

Actinorrodina

Medermicina



Mederrodina A

Figura 13-8. Bacteria modificada genéticamente. Se pueden sintetizar nuevos antibióticos utilizando este tipo de organismos modificados. La figura muestra uno de estos casos. Existen distintas especies de *Streptomyces* que producen antibióticos diferentes, aunque relacionados entre sí. Una de estas especies produce actinorrodina, de color azul a pH alcalino, y otra medermicina, de color marrón. Al clonar los genes de la segunda especie en un plásmido y transformar la primera especie, algunos de los transformantes son capaces de sintetizar un nuevo antibiótico, la mederrodina A, de color rojo-púrpura. Las estructuras de estos tres compuestos se muestran en la figura, así como extensiones en placa de las bacterias productoras correspondientes. La mederrodina A es similar a la medermicina, pero contiene un grupo hidroxilo en la posición 6. El segmento clonado determina probablemente una hidroxilasa que se expresa cuando se introduce en una especie diferente. (Mervyn J. Bibb, John Innes Institute, United Kingdom.)

especie, siempre se inserta ectópicamente. (En las células eucariotas, los vectores con replicación autónoma son raros, de manera que la ruta de transformación estable más habitual suele ser la integración cromosómica).

La posibilidad de introducir transgenes en eucariotas tales como las plantas y los animales (incluidos los seres humanos) ha hecho posible que se desarrollen muchas estrategias experimentales nuevas, pues los genotipos pueden modificarse genéticamente para adecuarlos a los objetivos de un experimento concreto. Un ejemplo de ello en investigación básica es la utilización de genes testigos o delatores. A veces, es difícil detectar la actividad de un gen particular en el tejido donde normalmente se expresa. Este problema puede solucionarse colocando la región estructural de un gen cuyo producto sea fácilmente detectable, denominado **gen testigo**, bajo el control del promotor del gen en cuestión. El gen testigo «anunciará» dónde y cuándo se encuentra activo el gen en estudio. Más adelante en este capítulo veremos algunos ejemplos.

Además, debido a que las plantas, animales y hongos son básicos para una gran parte de la economía, los genotipos transgénicos «de diseño» están siendo ampliamente utilizados con fines aplicados. Un uso particularmente relevante es la terapia génica en los seres humanos, es decir, la introducción de un transgén funcional con el objetivo de reemplazar un alelo mutante residente o compensar esta deficiencia.

COROLARIO

La transgénesis, es decir, el diseño de un genotipo específico mediante la adición de DNA exógeno a un genoma, supone una ampliación de la mejora genética clásica, tanto para la investigación básica como con fines comerciales.

A continuación, trataremos algunas de las técnicas especializadas de la tecnología del DNA recombinante que se utilizan en eucariotas como la levadura del pan, las plantas y los animales, así como en el área de la terapia génica.

Ingeniería genética en la levadura del pan

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en el organismo modelo eucariótico más sofisticado para la tecnología del DNA recombinante. Uno de los principales motivos es que la Genética de transmisión de esta levadura se conoce excepcionalmente bien; a esto se une la existencia de una vasta colección de mutantes que expresan cientos de fenotipos diferentes, un recurso de gran valor cuando se utiliza la levadura como sistema molecular. Otra ventaja importante es la disponibilidad de un plásmido circular de 6.3 kb que se encuentra en este organismo de forma natural. Este plásmido, por tener una circunferencia de 2 μm, se conoce como el plásmido de «2 micras», y constituye el esqueleto de una serie de vectores de clonación sofisticados que se transmiten a los productos celulares tanto de la mitosis como de la meiosis.

Los vectores de levaduras más sencillos son derivados de plásmidos bacterianos en los que se ha introducido un gen de levadura de interés (Fig. 13-11*a*). Cuando se transforman las células de levadura con estas construcciones, los plásmidos suelen insertarse en uno de los cromosomas por recombinación homóloga con el gen residente, ya sea mediante uno o dos entrecruzamientos (Fig. 13-12). Como resultado, o bien se integra todo el plásmido o el alelo residente es reemplazado por el alelo plasmídico. Para detectar las integraciones, se crecen las células en un medio que seleccione el alelo plasmídico. Como los plásmidos bacterianos no pueden replicarse en levaduras, sólo mediante integración se obtendrá un genotipo modificado de forma estable con estos vectores.

Se pueden generar construcciones con varias propiedades interesantes tomando como base el plásmido de 2 μm, e incorporando otras secuencias de levadura y de bacterias (Fig. 13-11*b*). En primer lugar, el segmento de 2 μm permite la replicación autónoma en la levadura, y así la integración en el cromosoma no es necesaria para que se produzca una transformación estable. En segundo lugar, podemos utilizarlo para introducir diferentes genes en la levadura y estudiar su efecto en este organismo; ade-

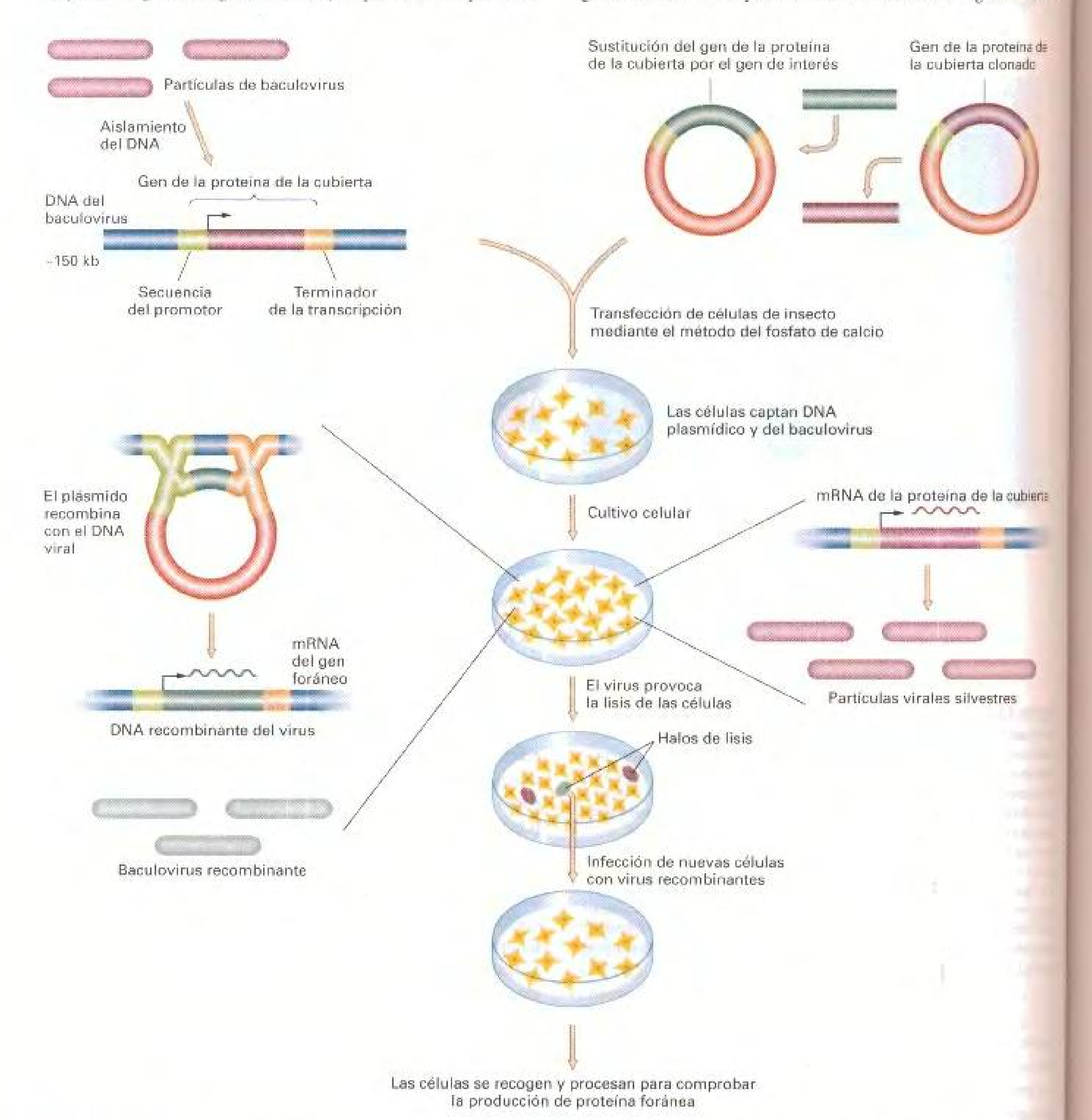


Figura 13-9. El baculovirus es un virus de DNA con un genoma muy grande (aproximadamente 150 kb) que infecta células de insectos. Para expresar un gen foráneo en baculovirus, se clona en un plásmido que contiene una pequeña parte del genoma del virus sustituyendo al gen que cifra la proteína de la cubierta viral. El plásmido recombinante se cotransfecta en células de insecto junto con DNA silvestre del baculovirus. Aunque con baja frecuencia, el plásmido y el DNA viral sufren recombinación homóloga, dando lugar a la inserción del gen foráneo en el genoma del virus. Cuando aparecen los halos de lisis, es posible diferenciar aquellos que derivan de virus recombinantes porque su apariencia es distinta debido a la falta de la proteína de la cubierta. Estos halos se aíslan y se amplifican y se utilizan para infectar cultivos frescos de células de insectos, obteniendo así un nivel elevado de expresión de la proteína foránea de interés. (Copyright © 1992 de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed Copyright © Scientific American Books.)

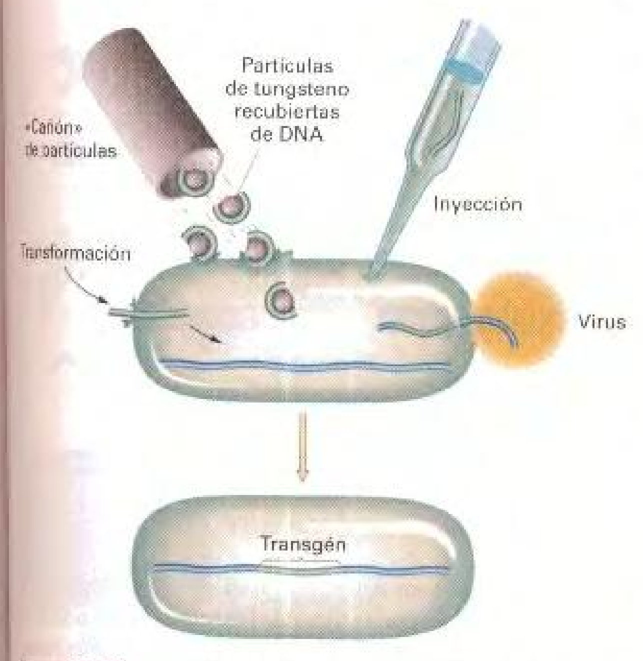
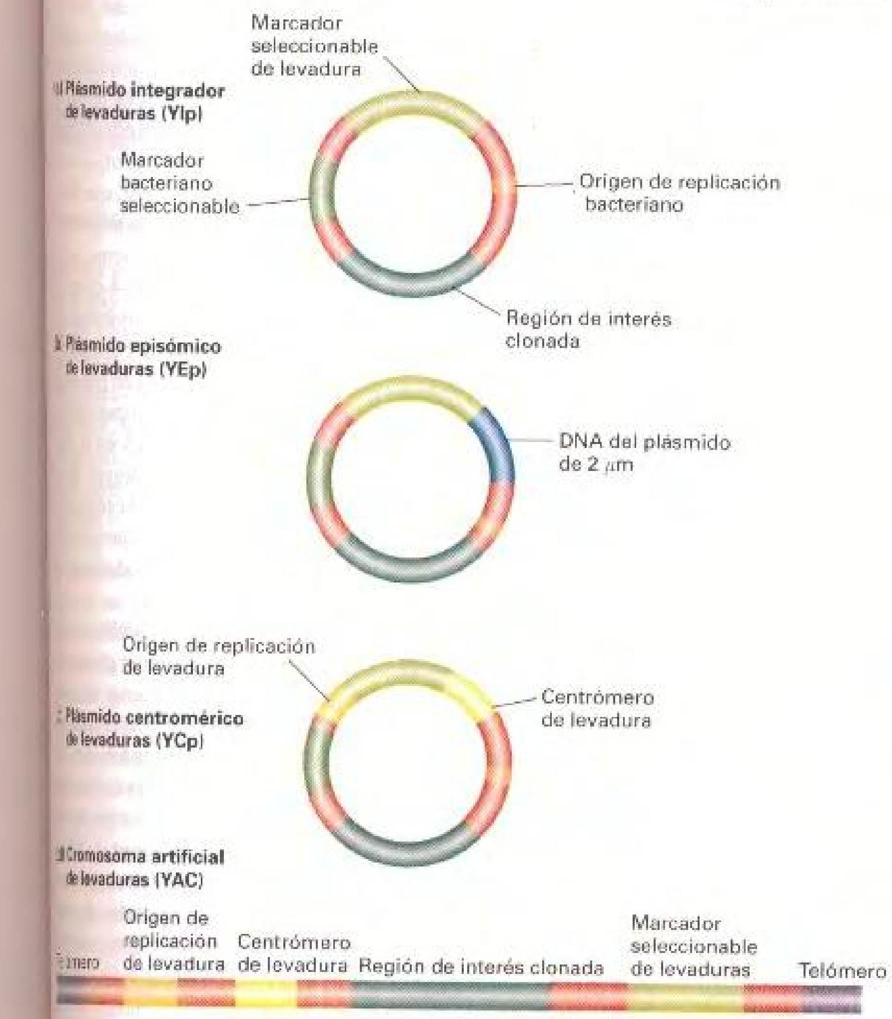


Figura 13-10. Algunos métodos para introducir DNA foráneo en células.



más, el plásmido puede aislarse de la levadura e introducirse de nuevo en *E. coli*, siempre que contenga un origen de replicación y un marcador seleccionable bacteriano. Estos **vectores transbordadores** son muy útiles para la manipulación y clonación rutinaria de genes de levaduras.

Con cualquier plásmido que se replique autónomamente, cabe la posibilidad de que alguna célula hija no herede ninguna copia, ya que el reparto de copias del plásmido a las células hijas es un proceso aleatorio que depende de la localización de los plásmidos en la célula en el momento de la formación de la nueva pared celular. Sin embargo, si se añade al plásmido un segmento de DNA de levaduras que contenga un centrómero (Fig. 13-11*c*), entonces el huso acromático que asegura la segregación correcta de los cromosomas tratará al plásmido como si se tratara de un cromosoma y lo repartirá a las células hijas durante la división celular. La adición de un centrómero es un primer paso hacia la construcción de cromosomas artificiales. En una segunda etapa, el plásmido centromérico es convertido en una molécula lineal a la que se añade en sus extremos el DNA de los telómeros de la levadura (Fig. 13-11*d*). Cuando esta construcción contiene además orígenes de replicación de levadura (secuencias de replicación autónoma o ARS) constituye un **cromosoma artificial de levadura** (YAC, del inglés *yeast artificial chromosome*), que se comporta en muchos sentidos como un pequeño cromosoma de

Figura 13-11. Representación esquemática de cuatro tipos de plásmidos diferentes utilizados en levadura. En la figura, cada uno de ellos se emplea como vector para la región genética de interés insertada. La función de estas regiones puede estudiarse transformando una estirpe de levadura con el genotipo adecuado. Para la detección rutinaria de la presencia del plásmido en bacterias y levaduras, es necesario utilizar marcadores seleccionables. Los orígenes de replicación son secuencias que las enzimas de replicación bacterianas o de levadura necesitan para iniciar el proceso de replicación. (El DNA derivado del plásmido natural de 2 μm de levadura contiene sus propios orígenes de replicación.)

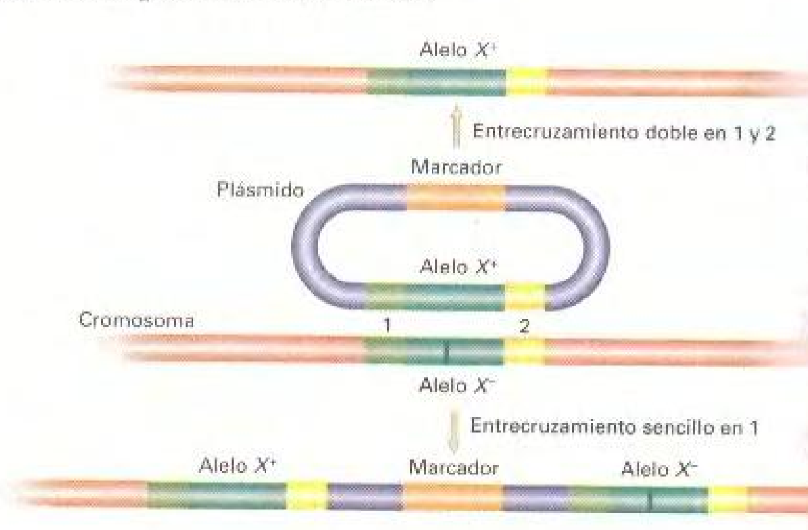


Figura 13-12. Dos mecanismos posibles para transformar una estirpe de levadura X^- con un plásmido portador de un alelo funcional (X^+). El sitio mutante del alelo X^- se representa como una barra vertical verde oscura. Aunque no se muestra, también pueden producirse entrecruzamientos sencillos en la posición 2.

levadura durante la mitosis y la meiosis. Por ejemplo, cuando dos células haploides, una portadora de un YAC *ura*$^-$ y otra de un YAC *ura*$^-$, se fusionan para formar un diploide, la mayoría de las tétradas mostrarán la segregación típica 2:2 que esperaríamos si estos dos elementos se comportaran como cromosomas.

Los plásmidos centroméricos pueden utilizarse para estudiar los elementos reguladores de un gen (Fig. 13-13). Para ello, las secuencias reguladoras y la región estructural de un gen se insertan en un plásmido, que puede seleccionarse mediante un marcador independiente de levaduras como el *ura3*$^+$. La región reguladora se puede manipular, generando un conjunto de deleciones seriadas que se obtienen digiriendo de forma controlada y unidireccional el DNA hasta diferentes posiciones con una exonucleasa específica y, finalmente, reuniendo los extremos. El objetivo experimental consiste en determinar cuál de estas deleciones (el fragmento mínimo) permite todavía el funcionamiento normal del gen. El ensayo consiste en transformar con los diferentes plásmidos una estirpe mutante en el locus cromosómico que estamos estudiando y analizar si se recupera fenotípicamente. Los resultados de este tipo de experimentos generalmente permiten definir la región necesaria para la adecuada regulación del gen.

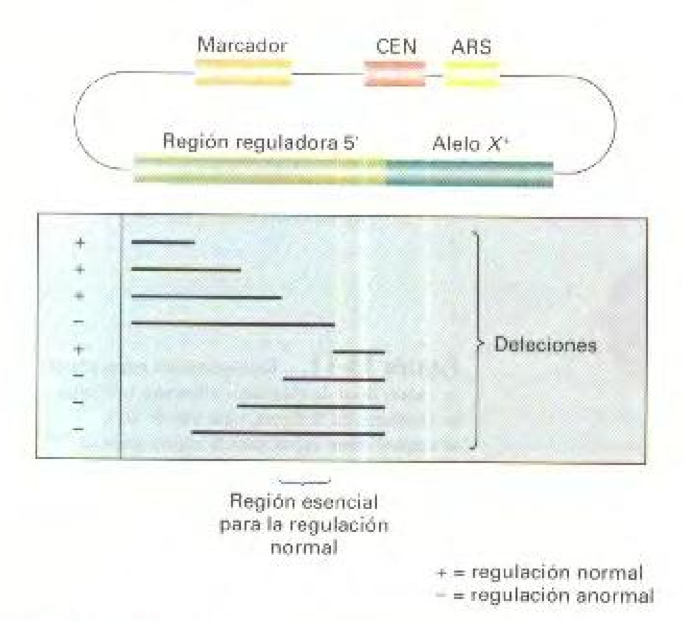


Figura 13-13. Para estudiar la regulación del alelo X^+ de levadura, se puede manipular su región reguladora generando deleciones *in vitro* e introduciendo las construcciones resultantes en levaduras mutantes X^- (CEN = secuencia centromérica; ARS = secuencia de replicación autónoma).

En este tipo de estudios sobre las regiones reguladoras, suele ser más práctico utilizar un gen testigo en lugar del gen que estamos estudiando. Por ejemplo, si estamos interesados en la regulación del gen *X*, fusionaríamos el promotor de este gen con la región estructural del testigo. Un gen que se ha utilizado profusamente como testigo en las levaduras es el gen bacteriano *lacZ*, que determina la enzima β-galactosidasa. La función normal de esta enzima es la degradación de la lactosa, pero también puede actuar sobre un compuesto análogo denominado X-Gal (5-bromo-4-cloro-indolil-β, D-galactósido) y dar lugar a 5-bromo-4-cloroíndigo, un compuesto de color azul intenso, que confiere esta coloración a las colonias de levadura que expresan *lacZ* y crecen en presencia de X-Gal. (En el Capítulo 12, vimos que esta misma enzima también se utiliza para detectar la inserción de DNA en el plásmido pUC18). Normalmente, las fusiones se construyen de tal manera que el promotor más algunos codones de la región estructural del gen *X* se fusionan en fase con la región que determina la β-galactosidasa, y estas construcciones se introducen en un vector no integrativo para transformar la levadura.

Los cromosomas artificiales de levadura se han utilizado ampliamente como vectores de clonación de segmentos grandes de DNA eucariótico (sobre todo, humano). Hay que tener en cuenta, por ejemplo, que el tamaño de la región estructural del gen del factor VIII de coagulación humano es aproximadamente [illegible] kb, o que el gen de la distrofia muscular de Duchenne mide unas 1000 kb. Además, dado el gran tamaño de los genomas de mamíferos, necesitaríamos construir genotecas enormes si utilizáramos vectores bacterianos. Puesto que los cromosomas artificiales de levadura admiten insertos mucho más grandes, de hasta 1000 kb, el tamaño de las genotecas derivadas de estos vectores puede reducirse proporcionalmente. En el Capítulo 14 volveremos a tratar este tema.

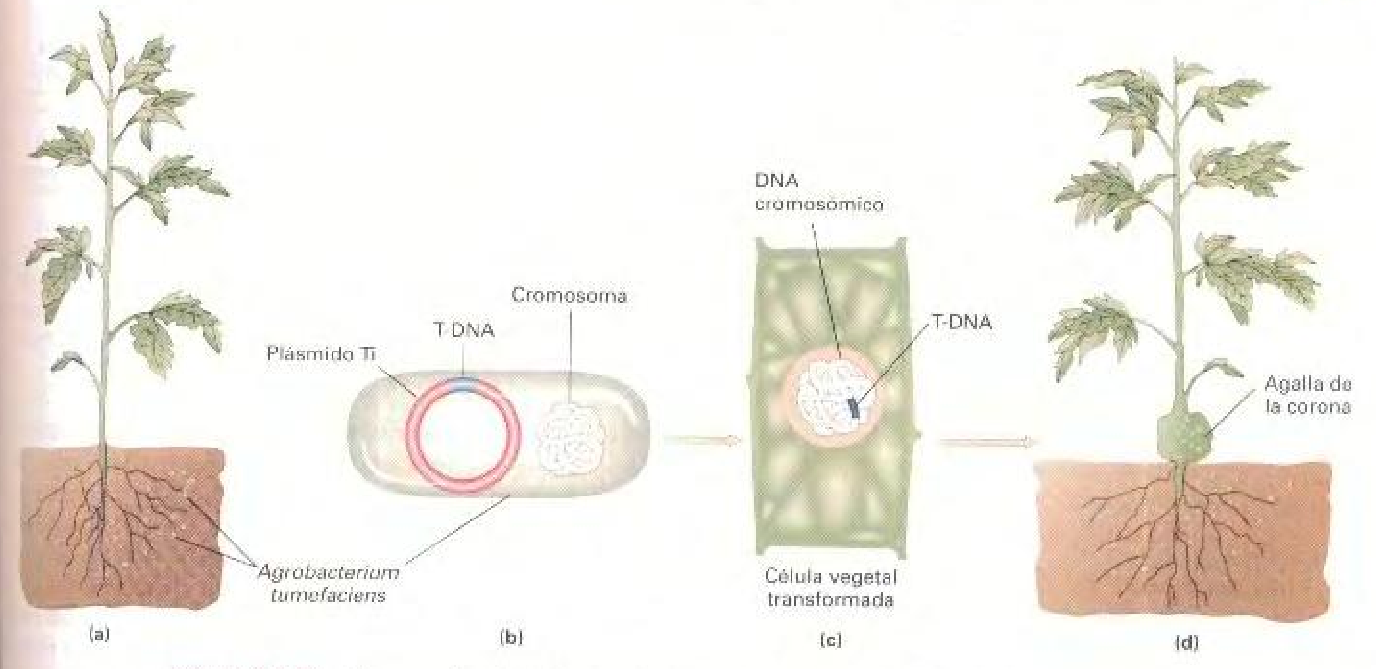


Figura 13-14. Para causar la enfermedad de la agalla de la corona, la bacteria *A. tumefaciens* inserta una parte de su plásmido Ti, denominada T-DNA, en un cromosoma de la planta hospedadora.

COROLARIO

Los vectores de levaduras pueden ser integrativos, replicativos o parecerse a cromosomas artificiales, permitiendo el aislamiento de genes, su manipulación y su reinserción para el análisis genético molecular.

Ingeniería genética en plantas

Debido a su importancia económica, desde hace mucho tiempo las plantas han sido objeto del análisis genético para la obtención de variedades mejoradas. La tecnología del DNA recombinante ha abierto una nueva dimensión a este esfuerzo, ya que las modificaciones genéticas que esta tecnología permite son casi ilimitadas. Los experimentos de mejora ya no están confinados a la selección de variantes dentro de una misma especie. Actualmente, puede introducirse DNA de otras especies de plantas, de animales o incluso de bacterias.

El plásmido Ti. Los únicos vectores que se utilizan de forma rutinaria para producir plantas transgénicas derivan de una bacteria del suelo denominada *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria causa la *enfermedad de la agalla de la corona*, provocando en la planta infectada el desarrollo de excrecencias de crecimiento incontrolado (tumores o agallas), normalmente en la base (corona) de la planta. El responsable de la formación de tumores es un plásmido de DNA circular de gran tamaño (200 kb) —el plásmido Ti del inglés *tumor-inducting*, inductor de tumor—). Cuando la bacteria infecta una célula de la planta, una parte del plásmido Ti denominada T-DNA se transfiere e inserta, aparentemente al azar, en el genoma de la planta hospedadora (Fig. 13-14). Los genes que determinan los productos requeridos para esta transferencia están situados en el plásmido Ti, pero fuera del T-DNA. No obstante, el T-DNA contiene varios genes de función clave, entre los que se incluyen los relacionados con la producción del tumor y con la síntesis de unos compuestos denominados *opinas*. En realidad, las opinas son sintetizadas por la planta infectada, pero bajo la dirección del T-DNA. Luego, la bacteria utiliza las opinas para su propio beneficio gracias a los genes de utilización de las opinas situados en el plásmido Ti. La nopalina y la octopina son dos de las opinas más importantes, y se producen por plásmidos Ti independientes. En la Figura 13-15 se muestra la estructura del plásmido Ti.

Gracias a su comportamiento natural, el plásmido Ti es muy adecuado para su utilización como vector de plantas. La idea

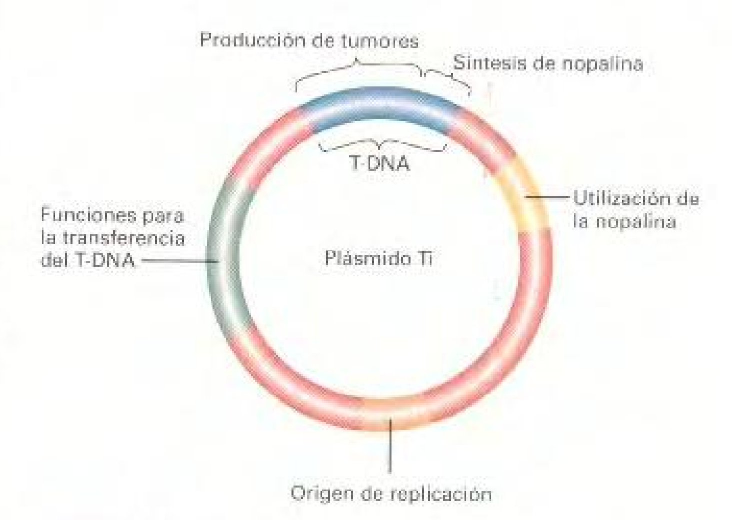


Figura 13-15. Representación simplificada de las regiones principales del plásmido Ti de *A. tumefaciens*. Cuando el T-DNA se inserta en el DNA cromosómico de la planta hospedadora, dirige la síntesis de nopalina, que la bacteria utiliza luego para sus propios fines. El T-DNA también provoca la división incontrolada de la célula vegetal, que da lugar a la formación de un tumor.

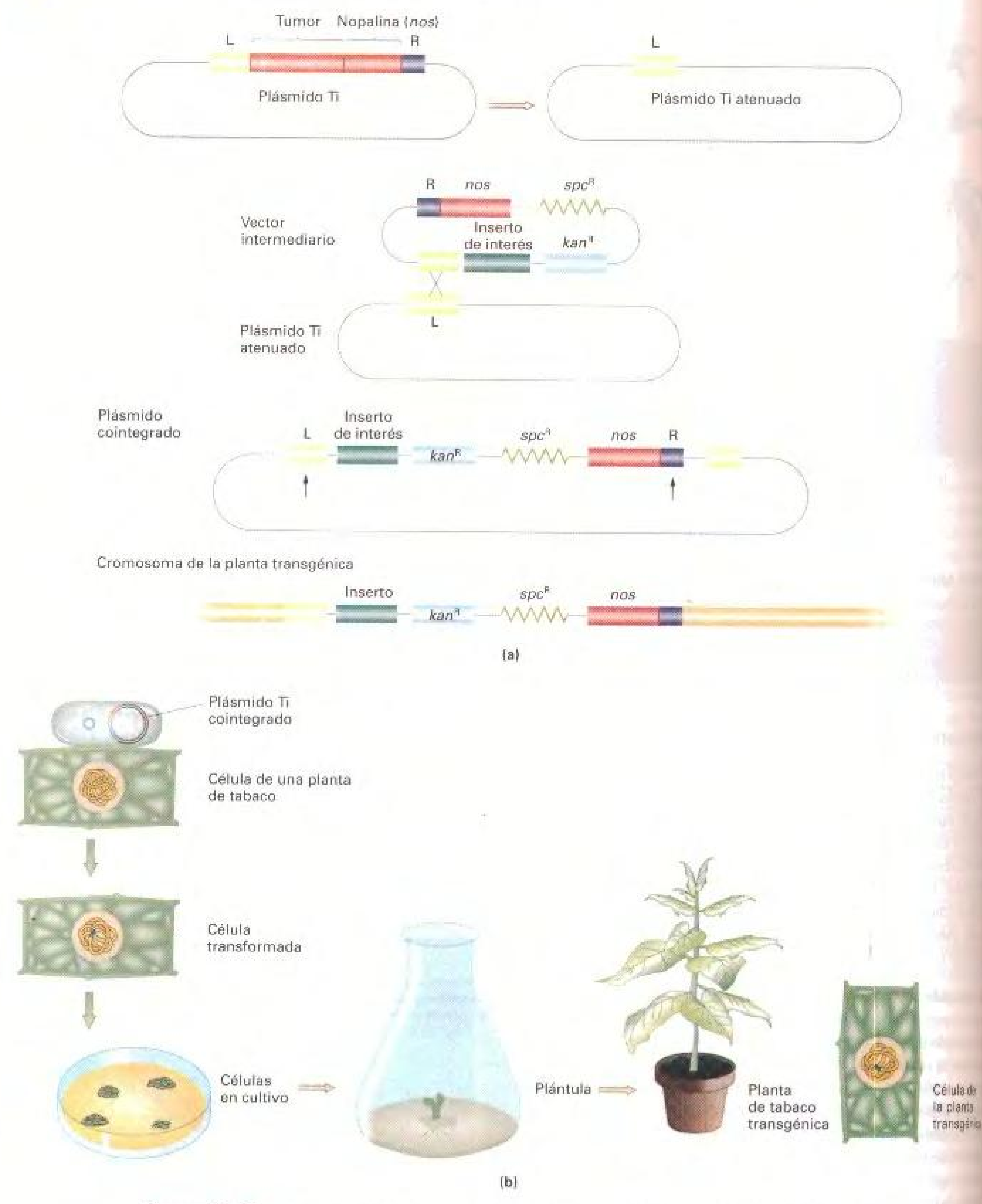


Figura 13-16. (a) Para producir plantas transgénicas, se utiliza un vector intermediario de un tamaño manejable para clonar el fragmento de interés. En el método que se muestra, el vector intermediario se integra por recombinación en un plásmido Ti atenuado («desarmado») para generar una estructura cointegrada portadora del gen de interés y un marcador seleccionable de resistencia a kanamicina entre los extremos del T-DNA, que es todo lo que se necesita para promover la inserción. (L, región izquierda; R, región derecha). (b) Obtención de una planta transgénica mediante la regeneración de una planta completa a partir de una célula transformada con el T-DNA.

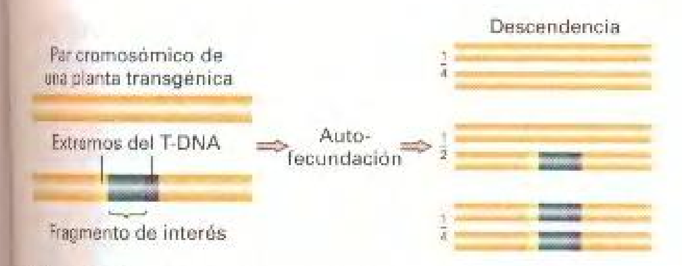


Figura 13-17. El T-DNA y cualquier fragmento que contenga se inserta en un cromosoma de la planta transgénica y después se transmite con un patrón de herencia mendeliano.

básica consiste en que si un DNA de interés pudiera insertarse en el T-DNA, entonces el T-DNA recombinante se integraría de forma estable en el cromosoma de la planta. Se ha diseñado un sistema que funciona precisamente así, aunque con algunas modificaciones necesarias. Examinemos un protocolo.

Los plásmidos Ti son demasiado grandes para ser manipulados fácilmente y es difícil reducir su tamaño porque contienen pocos sitios de restricción únicos. Por ello, nos servimos de un vector intermediario, más pequeño, en el que inicialmente se introduce el inserto de interés, junto con otros genes y secuencias necesarias para la recombinación, replicación y resistencia a un antibiótico. Este vector intermediario se inserta entonces en el plásmido Ti, originando un plásmido compuesto o «cointegrado» que puede introducirse en una célula vegetal por transformación. La Figura 13-16*a* muestra un método para la construcción del cointegrado. Primero se atenúa o «desarma» el plásmido Ti en el que se insertará el vector intermediario; es decir, se elimina toda la región derecha de su T-DNA, incluyendo los genes inductores de tumores y de síntesis de nopalina. De este modo, se elimina la capacidad de provocar tumores, una característica bastante poco deseable del T-DNA. El extremo izquierdo (L) del T-DNA, que es donde se incorporará el vector intermediario por recombinación, se retiene. El vector intermedio contiene una secuencia con varios sitios de restricción únicos que resulta muy conveniente para la clonación. En la Figura 13-16, el gen de interés se ha insertado en esta región. Además, el vector contiene un gen bacteriano (spc^R) de resistencia a espectinomicina; un gen bacteriano de resistencia a kanamicina (kan^R), modificado para su expresión en plantas; y dos segmentos del T-DNA. Uno de los segmentos contiene el gen que determina la síntesis de nopalina (*nos*) y el extremo derecho del T-DNA (R). El otro segmento del T-DNA procede de una región cercana al extremo izquierdo y permite la recombinación homóloga con una parte de la región L que se ha mantenido en el plásmido Ti «desarmado». Una vez que los vectores intermediarios se han introducido en las células de *Agrobacterium* portadoras del plásmido Ti desarmado (mediante conjugación con *E. coli*), los recombinantes entre ambos plásmidos se seleccionan mediante siembra en presencia de espectinomicina. Las colonias bacterianas seleccionadas contendrán sólo el plásmido Ti recombinante, ya que el vector intermediario es incapaz de replicarse en *Agrobacterium*.

Como se muestra en la Figura 13-16*b*, tras la selección de los cointegrados con espectinomicina, las bacterias portadoras de estos plásmidos recombinantes se utilizan para infectar porciones de tejidos de las plantas, tales como discos de hoja. Si las células vegetales son infectadas, cualquier material genético situado entre los extremos derecho e izquierdo del T-DNA se insertará en los cromosomas de la planta. Si los discos de hoja se colocan en un medio con kanamicina, las únicas células que se dividirán serán aquellas que hayan adquirido el gen kan^R por transferencia del T-DNA. El crecimiento de estas células da lugar a la formación de un callo, que constituye una indicación de que ha ocurrido la transformación. Tras inducir la producción de brotes y raíces a partir de esos callos, las plántulas se trasplantan al suelo para que se desarrollen en plantas transgénicas (Fig. 13-16*b*). Es habitual que sólo se detecte un inserto de T-DNA en estas plantas, que segrega en meiosis como un alelo mendeliano normal (Fig. 13-17). El inserto puede detectarse con una sonda específica del T-DNA mediante la técnica de Southern o verificando la síntesis de nopalina en el tejido transgénico.

Expresión del DNA clonado. El DNA clonado en el T-DNA puede ser cualquier DNA que el investigador desee insertar en la planta de interés. Un gen foráneo particularmente llamativo que se ha insertado a través del T-DNA es el gen que cifra la luciferasa, una enzima que se encuentra en las luciérnagas. Esta enzima cataliza una reacción entre el compuesto luciferina y el ATP; en este proceso, se emite luz, y gracias a él, las luciérnagas brillan en la oscuridad. Una planta de tabaco transgénica que exprese el gen de la luciferasa también brillará en la oscuridad cuando se riegue con una solución que contenga luciferina (como puede verse en la fotografía al inicio del capítulo). Aunque este tipo de manipulación podría parecer un intento de desarrollar una tecnología para producir árboles de Navidad que no requieran luces, el gen de la luciferasa es realmente muy útil como gen testigo para estudiar la expresión de un gen durante el desarrollo. En otras palabras, podemos fusionar el promotor de cualquier gen que nos interese con el gen de la luciferasa e insertar esta construcción en una planta mediante un T-DNA. Así, el gen de la luciferasa seguirá el mismo patrón de expresión durante el desarrollo que el gen cuyo promotor fusionamos, pero gracias a la emisión de luz debida a la luciferasa podremos visualizar la actividad de estas secuencias reguladoras en diferentes momentos o tejidos.

Otros genes utilizados como testigos en las plantas son el gen bacteriano *GUS* (β-glucuronidasa) que convierte el compuesto X-Gluc en un pigmento azul, y el gen bacteriano *lac* (β-galactosidasa), que actúa sobre el X-Gal de modo análogo. Las células donde se expresan estos genes adoptan una coloración azul, que puede observarse a simple vista o con el microscopio.

Actualmente, ya se han comercializado varias plantas transgénicas portadoras de una diversidad de genes foráneos y muchas más se encuentran en fase de desarrollo. No sólo se están manipulando las propias características de las plantas, sino que, como los microorganismos, las plantas se están utilizando también como «fábricas» para producir proteínas a partir de genes foráneos.

Cultivos transgénicos

En noviembre de 1996, muchos periódicos británicos mostraron en sus portadas fotografías de botes hinchables de la organiza-







Figura 13-18. *(Arriba)* Taladro del maíz europeo. (Mycogen). *(Centro)* La fumigación de las filas de la izquierda con el herbicida «Roundup», que contiene glifosilato, ha eliminado las malas hierbas, pero el maíz resistente por modificación genética sobrevive. (Monsanto Corporation). *(Abajo)* Algodón Bt, modificado genéticamente para ser resistente al ataque de insectos *(izquierda)*, en comparación con el algodón no modificado *(derecha)*. (Monsanto Corporation.)

ción Greenpeace bloqueando la entrada de un buque de carga en el puerto de Liverpool. En una lancha cercana, se había colocado una pancarta enorme con las siguientes palabras: «Compuerta: Contaminación Genética». La protesta estaba dirigida en contra del primer envío de soja modificada genéticamente desde Estados Unidos a Gran Bretaña. Al mes siguiente, Greenpeace estaba en el puerto de Hamburgo, en Alemania, utilizando un potente proyector de diapositivas para proyectar las palabras «Experimento genético: no lo compre» sobre el costado de un buque de carga similar. La soja contenía un transgén bacteriano que confería resistencia a un herbicida denominado glifosilato; de este modo, los campos de soja podían fumigarse con glifosilato y mantenerlos libres de malas hierbas. Las ventajas para el agricultor son obvias, pues las malas hierbas son un verdadero problema para las cosechas. La objeción de los manifestantes a esta planta transgénica era que el transgén podía resultar perjudicial para la salud humana. Una de las preocupaciones era que el producto del transgén indujera reacciones alérgicas. La compañía que desarrolló la soja aseguró que no existía ningún peligro, una visión también defendida por varios organismos reguladores oficiales. Otro de los temores era que, como resultado de la resistencia de la planta, los consumidores se vieran expuestos a niveles superiores de herbicidas. Una preocupación adicional era que las plantas modificadas genéticamente pudieran «escapar» e introducir los transgenes en especies relacionadas.

Tanto si estas objeciones son válidas como si no, Greenpeace en cierto modo acertó al mencionar una «compuerta» en su pancarta, pues las plantas transgénicas están «inundando» los campos de cultivo y, por consiguiente, los mercados. Popularmente se las conoce como «comida GM» (comida modificada genéticamente, del inglés *Genetically Modified*). En 1998, los cultivos transgénicos de maíz, soja y colza ocupaban una extensión [illegible] veces mayor que en 1996. La realidad es que esta nueva tecnología tiene un inmenso beneficio potencial. ¿Qué otros ejemplos podemos citar? Otro de los eternos problemas para los agricultores es la destrucción de la cosecha por insectos. La bacteria *Bacillus thuringiensis* contiene 96 genes que determinan endotoxinas delta, unas proteínas que agujerean el tubo digestivo de las larvas de insectos y que se conocen como toxinas Bt. Los genes de las toxinas Bt, cuando se introducen en una planta bajo el control de un promotor fuerte, confieren resistencia al ataque por determinadas plagas de insectos. Por ejemplo, un determinado gen Bt confiere al maíz resistencia a una de las plagas más devastadoras, la del taladro europeo del maíz (Fig. 13-18). Este tipo de resistencia es particularmente deseable porque es específica, es decir, no tiene ningún efecto adverso sobre los humanos, otros mamíferos o insectos no perjudiciales. Los genes de las toxinas Bt, como los genes de resistencia a glifosilato, se insertan en el genoma de la planta mediante la técnica del T-DNA. En Norteamérica, se cultivan actualmente millones de acres de maíz, algodón y patata modificados genéticamente con genes de las toxinas Bt.

Otra área prometedora es la de la «agricultura molecular» que se basa en la construcción de plantas transgénicas que contienen productos beneficiosos para la salud como, por ejemplo, fármacos o vacunas. Las plantas productoras de vacunas son particularmente importantes en los países en vías de desarrollo,



Figura 13-19. *Drosophila* transgénica que expresa el gen de la β-galactosidasa bacteriana. La mosca se transformó con una construcción constituida por el gen *lacZ* de *E.coli* bajo el control de un promotor de *Drosophila* inducible por shock térmico. Las moscas resultantes se sometieron a un shock térmico, se sacrificaron inmediatamente y se analizó la actividad de la β-galactosidasa mediante la detección del pigmento azul producido. La figura muestra una mosca transgénica a la derecha y una normal a la izquierda. (John Lis.)

porque estas vacunas son baratas, se administran oralmente sin necesidad de utilizar técnicas especializadas (es probable que con comer una semilla sea suficiente) y son fáciles de transportar hasta áreas remotas (las vacunas convencionales requieren refrigeración y es habitual que pierdan sus propiedades en el camino).

Ingeniería genética en animales

Entre los animales más utilizados como sistemas modelo para la manipulación del DNA se encuentran *Caenorhabditis elegans* (un nematodo), *Drosophila* y el ratón. Muchas de las técnicas que hemos visto hasta ahora pueden aplicarse a estos organismos con ciertas modificaciones.

Animales transgénicos. Existen varios métodos para producir animales transgénicos. Un ejemplo es la transformación genética de *Drosophila* mediante inyección de vectores plasmídicos portadores de elementos *P* en los embriones tempranos de la mosca (descrita con detalle en el Cap. 20). Las moscas transgénicas constituyen un nuevo ejemplo de la utilidad del gen bacteriano *lacZ* como gen testigo en los estudios de regulación génica durante el desarrollo. El gen *lacZ* se fusiona a la región promotora de un gen de *Drosophila* inducible por shock térmico y esta construcción se utiliza para generar moscas transgénicas. Tras

Gen de interés
Promotor de la β-lactoglobulina
El DNA se inyecta en el pronúcleo
Óvulo de oveja
Pipeta de sujeción
Implante en la madre adoptiva
Los descendientes transgénicos se identifican por PCR
La expresión del gen de interes se produce sólo en tejido mamario
Obtención de leche de los animales transgénicos
El producto génico de interés se secreta a la leche
Fraccionamiento de las proteínas de la leche
Producto génico de interés purificado

Figura 13-20. Producción de una proteína de interés farmacológico en la leche de ovejas transgénicas. El gen de interés cifra una proteína de importancia terapéutica, como puede ser el activador del plasminógeno tisular que se utiliza para disolver coágulos sanguíneos en los seres humanos. El gen se coloca bajo el control del promotor de la β-lactoglobulina, activo sólo en tejido mamario, y se introduce en óvulos de oveja mediante microinyección del vector de expresión en el núcleo. Los óvulos inyectados se implantan en madres adoptivas, y la descendencia que expresa el transgén se identifica amplificando por PCR el DNA cromosómico con cebadores específicos de la secuencia de interés. Las ovejas transgénicas expresan el gen sólo en el tejido mamario y secretan altos niveles de la proteína correspondiente en la leche, de donde puede purificarse.

ser sometidas a un shock térmico, las moscas se sacrifican y se sumergen en una solución con X-Gal. El patrón de tejidos azules resultante corresponde a las principales zonas de acción de este gen activado por shock térmico (Fig. 13-19). También es posible generar animales transgénicos mediante inyección de vectores plasmídicos especializados en un huevo fertilizado (como veremos más adelante en este capítulo).

En ambos casos, debido a que inicialmente lo que se genera es un embrión transgénico, el DNA se incorporará a las células germinales y se transmitirá a la descendencia derivada de estas cé-

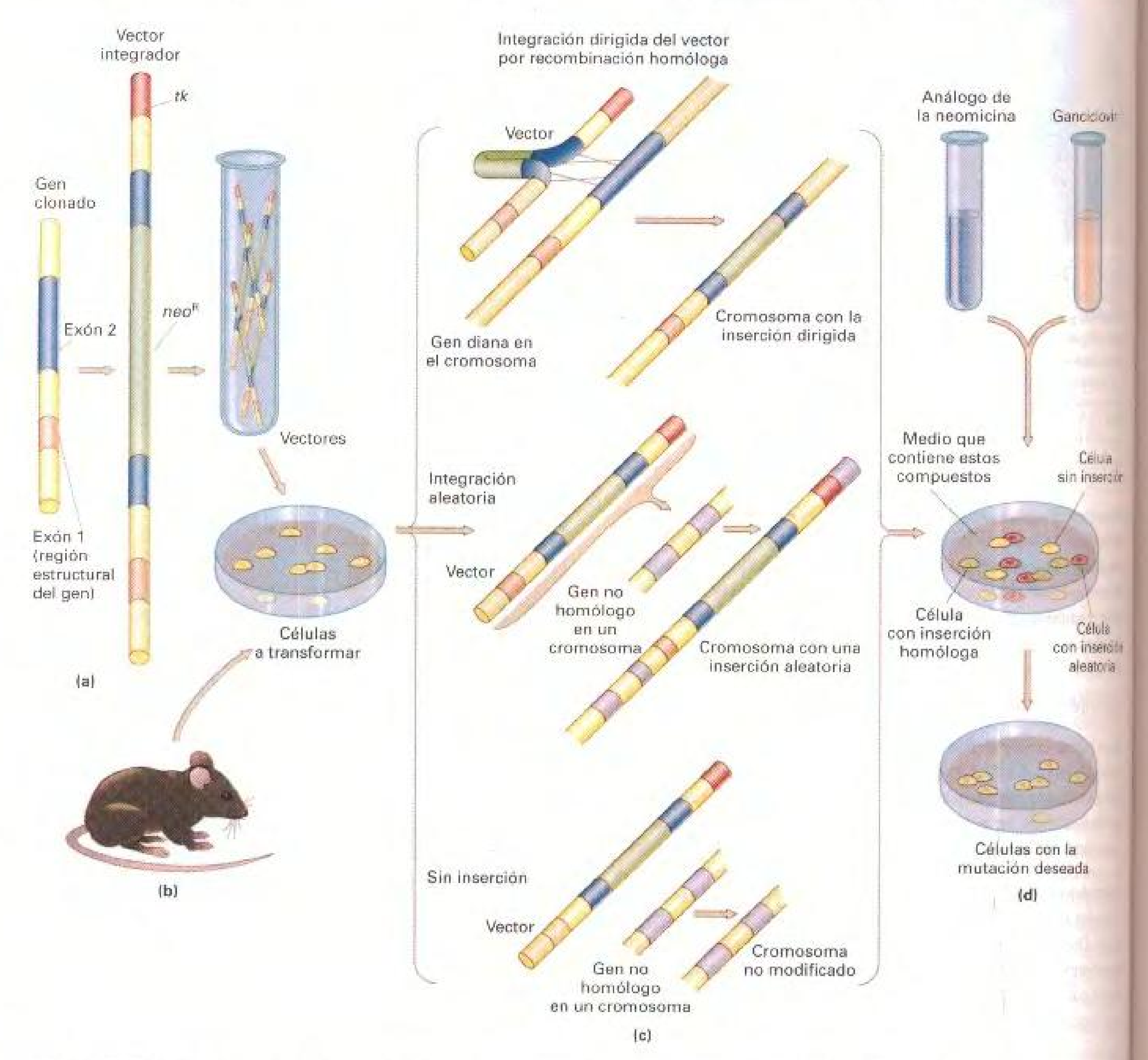


Figura 13-21. Producción de células que contienen una mutación en un gen específico (interrupción dirigida o *knockout*). (a) Se altera *in vitro* un gen clonado y se utiliza para obtener el vector integrativo. El gen que se muestra se ha inactivado mediante la inserción del gen neo^R (en verde) en la región estructural del gen (en azul). El gen neo^R será utilizado posteriormente como marcador para detectar la integración del vector en un cromosoma. El vector contiene un marcador adicional en un extremo, el gen *tk* de herpes (en rojo). Estos marcadores son los habituales, pero podrían utilizarse otros. (b) El vector completo se introduce en células aisladas a partir de embriones de ratón. (c) Cuando se produce una recombinación homóloga *(arriba)*, el gen original es sustituido por el DNA del vector que contiene el gen interrumpido, excluyendo el marcador del extremo (en rojo). En muchas otras células, sin embargo, se produce la integración aleatoria del vector completo (incluyendo el marcador del extremo) en cualquier cromosoma *(centro)* o ni siquiera se integra *(abajo)*. (d) Para aislar células portadoras de la mutación deseada, se cultivan las células en un medio con los compuestos químicos apropiados, en este caso el G148, un análogo de la neomicina, y el ganciclovir. El compuesto G148 es letal para las células que no contengan un gen neo^R funcional, y de este modo se eliminan las células en las que el vector no se ha integrado (en amarillo). A su vez, el ganciclovir es tóxico para las células portadoras del gen *tk*, con lo que se eliminan las células en las que el vector se ha integrado aleatoriamente (en rojo). Por consiguiente, las únicas células que sobreviven y proliferan son aquellas en las que se ha producido la integración homóloga (en verde). (Adaptado de M.R. Capecchi, «Targeted Gene Replacement.» Copyright © 1994 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

lulas, comportándose como cualquier gen nuclear. Como las plantas, los animales se manipulan no sólo para mejorar sus propias cualidades sino también para su utilización como fábricas de proteínas foráneas. Por ejemplo, dado que la obtención de leche en los mamíferos es un proceso relativamente fácil, podemos utilizar la leche como vehículo para la expresión y purificación de proteínas foráneas que serían mucho más difíciles de obtener por otros métodos sin sacrificar al animal (Fig. 13-20).

Interrupción y sustitución de genes en el ratón. En general, el ratón es el sistema modelo de mamíferos más utilizado. Además, la mayor parte de la tecnología general desarrollada para

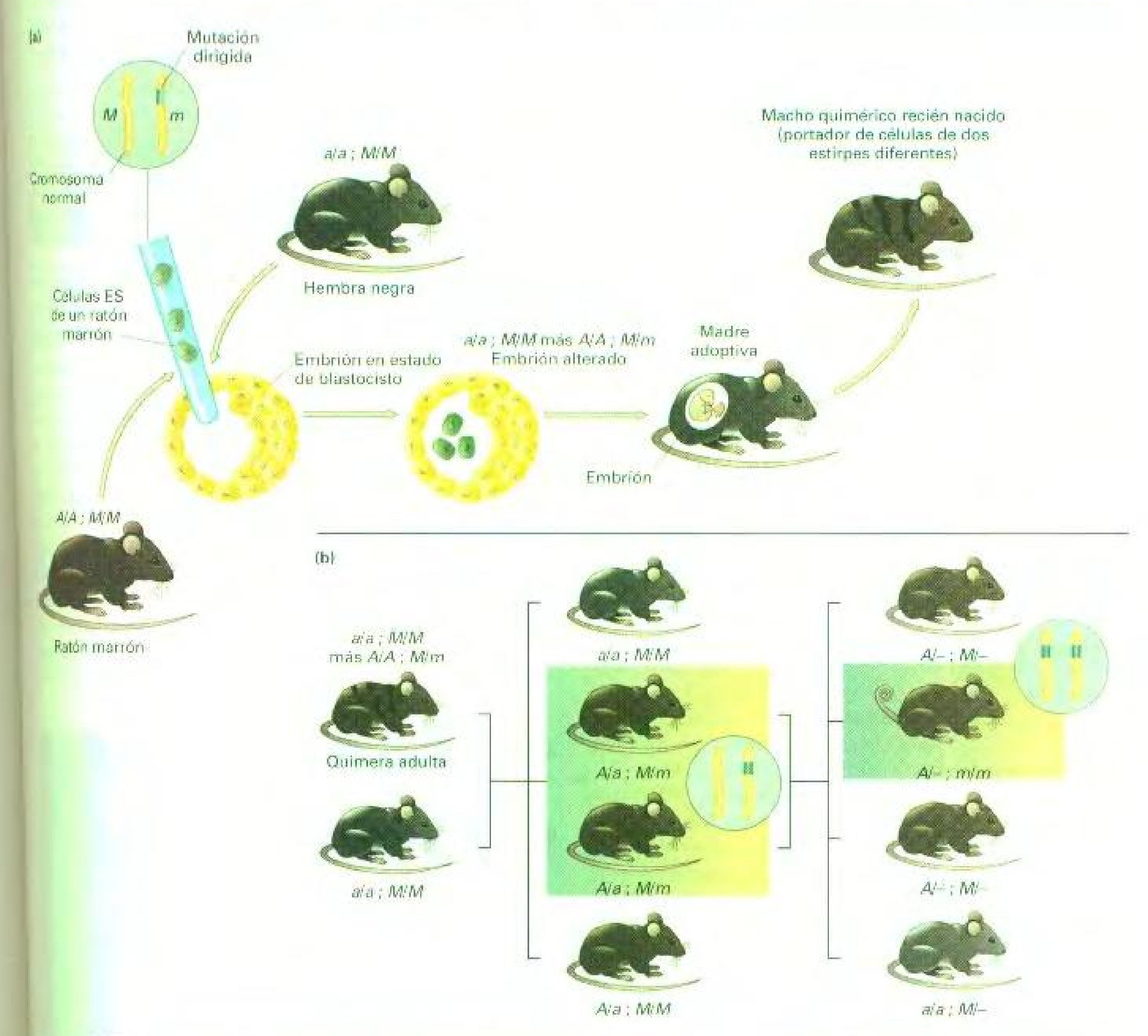


Figura 13-22. Obtención de un ratón *knockout* portador de la mutación dirigida. (a) Se aíslan células pluripotentes embrionarias (ES) *(de color verde en la parte izquierda)* a partir de una estirpe de ratones agutí y se les introduce una mutación dirigida en un cromosoma. Las células ES alteradas se introducen en embriones jóvenes procedentes de una estirpe de pelaje negro que carece del alelo dominante agutí (ver el Capítulo 4), como el que se muestra en la figura, y así el color del pelaje de los recién nacidos permite determinar si las células ES trasplantadas sobrevivieron en el embrión. Se implantan los embriones portadores de las células ES en madres adoptivas, en las que se desarrollan. Los ratones recién nacidos con parches de pelaje de color negro y agutí, denominados quimeras porque contienen células derivadas de dos estirpes diferentes, reflejan que las células ES han sobrevivido y proliferado en el animal. Los ratones totalmente negros, sin embargo, tras haber perdido las células ES, por lo que son descartados. *A* simboliza agutí; *a* negro; *m* es la mutación dirigida y *M* el alelo silvestre. (b) Los machos quiméricos se cruzan con hembras negras (no agutí). Se analiza la presencia de la mutación deseada en la descendencia (verde en el *círculo*). El examen directo de estos genes en los ratones agutí permite determinar cuáles de estos heredaron la mutación *(en el recuadro)*. Se cruzan machos y hembras portadores de la mutación para llegar a ratones homocigóticos para la mutación introducida *(en el recuadro)* y que, por lo tanto, carecen de una copia funcional del gen, y se confirma el genotipo analizando directamente su DNA. La mutación origina un fenotipo de cola enrollada. (Adaptado de M.R. Capecchi, «Targeted Gene Replacement.» Copyright ©1994 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos).

ratones suele ser aplicable a los seres humanos. Dos técnicas clave son la interrupción de genes (en los estudios de Genética inversa) y la sustitución de un alelo por otro. Analizaremos ejemplos de ambas técnicas.

A menudo, nos referimos a las interrupciones génicas con el término inglés *knockout* (fuera de combate). Una vez obtenida la interrupción génica, debemos analizar el organismo mutante en busca de fenotipo. Los ratones *knockout* son modelos de gran valor para el estudio de mutantes que presentan un fenotipo similar en humanos. Por ejemplo, se han generado ratones carentes de enzimas esenciales para la reparación del DNA (Cap. 7) para determinar si estas enzimas están relacionadas con las tasas de aparición de tumores.

Las Figuras 13-21 y 13-22 muestran, paso a paso, el método para generar un ratón *knockout*. Primero, se utiliza un gen clonado, en el que se ha introducido una interrupción, para producir células embrionarias pluripotentes (ES, del inglés *Embryonic Stem Cells*) portadoras de la interrupción génica (Fig. 13-21*a*). Aunque el gen defectuoso se inserta mucho más frecuentemente por recombinación no homóloga (integración ectópica) que por recombinación homóloga, se han diseñado estrategias para seleccionar positivamente las integraciones homólogas y negativamente las ectópicas, como se muestra en la Figura 13-21*d*. En segundo lugar, las células ES portadoras de una copia del gen interrumpido se inyectan en un embrión temprano (Fig. 13-22). La descendencia resultante es quimérica, pues contiene tejidos derivados tanto de las células receptoras como de las células ES trasplantadas. Finalmente, se cruzan entre sí ratones quiméricos para producir ratones homocigóticos para la interrupción.

COROLARIO

Los genes de hongos, plantas y animales pueden manipularse en bacterias y ser reintroducidos en las células eucarióticas, donde suelen integrarse en el DNA cromosómico.

La tecnología que se utiliza para la sustitución de genes en mamíferos es similar a la desarrollada para generar interrupciones génicas. En los experimentos de terapia génica, se reemplaza

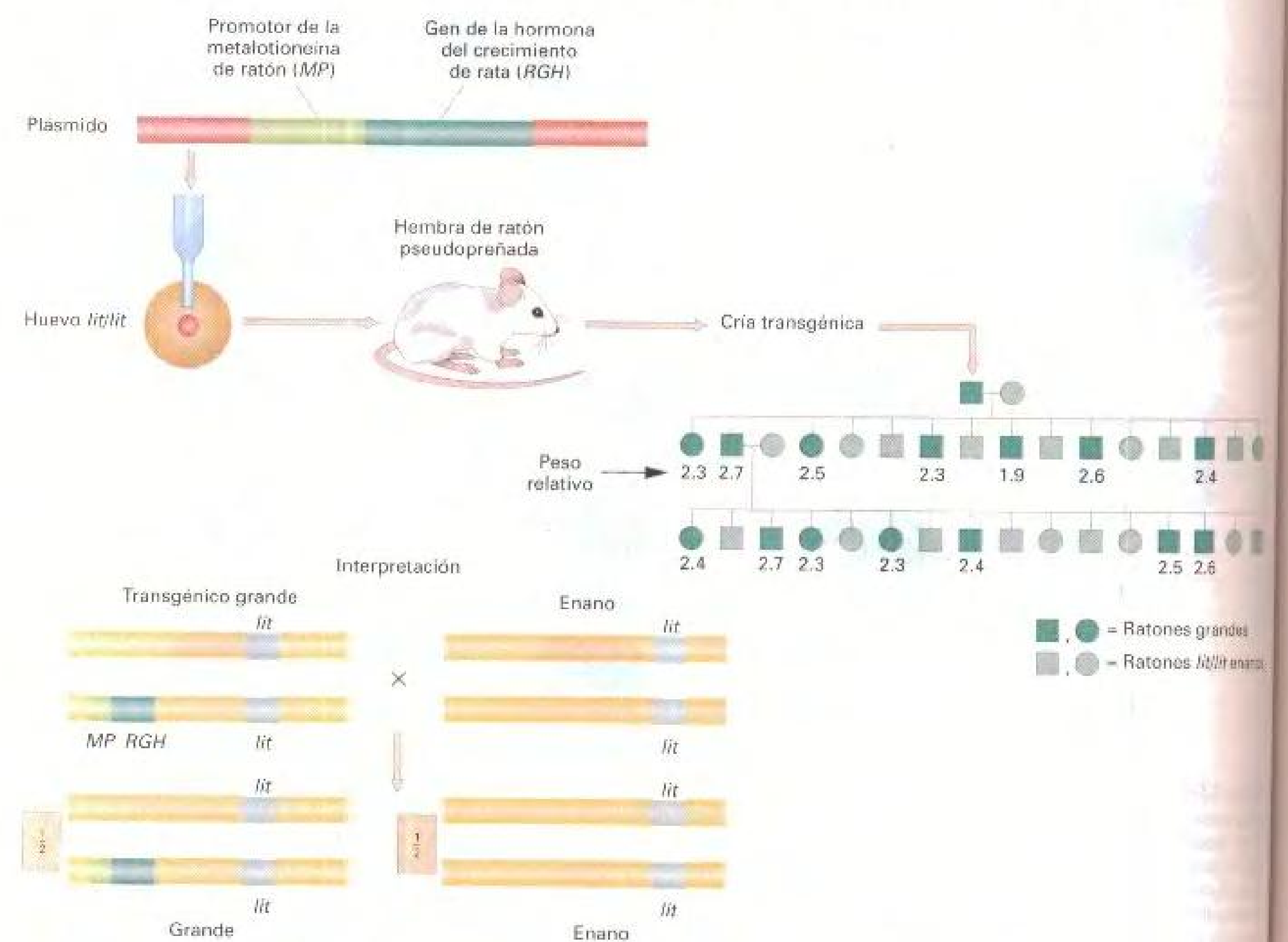


Figura 13-23. El gen de la hormona del crecimiento de la rata (*RGH*), bajo el control de un promotor de ratón que responde a la presencia de metales pesados, se inserta en un plásmido y se utiliza para producir un ratón transgénico. *RGH* compensa el enanismo inherente (*lit/lit*) del ratón y se hereda con un patrón de herencia mendeliana dominante en el pedigrí representado.

un alelo mutante por el alelo silvestre, suministrando así una cura para la condición mutante.

Terapia génica

La estrategia general que se utiliza para la terapia génica no es más que una extensión de la técnica de selección clonal por complementación funcional (Cap. 12). Primero, la función ausente en el organismo receptor como consecuencia de la presencia de un gen defectuoso se introduce en un vector; a continuación, este vector se inserta en uno de los cromosomas receptores y genera un organismo transgénico que se ha «curado» genéticamente. Esta técnica tiene un enorme potencial en los seres humanos, porque nos ofrece la esperanza de corregir las enfermedades genéticas, aunque también se están realizando experimentos de terapia génica en otros mamíferos.

El primer ejemplo de terapia génica en mamíferos fue la corrección de la deficiencia en la producción de la hormona del crecimiento en ratones. La mutación recesiva *little* (*lit*) produce ratones enanos. A pesar de que estos ratones tienen un gen de la hormona del crecimiento aparentemente normal, no producen mRNA a partir de este gen. Para corregir este defecto, se fusionó la región estructural del gen de la hormona de crecimiento de rata (*RGH*) al promotor del gen de la metalotioneína de ratón (*MP*). Un segmento de DNA lineal que contenía unas 5000 copias de esta construcción de 5 kb, se inyectó en huevos *lit*/*lit*. La función normal de la metalotioneína es la detoxificación de los metales pesados, por lo que la región reguladora responde a la presencia de metales pesados en el animal. Los cigotos inyectados se implantaron en hembras pseudopreñadas para obtener una camada. Aproximadamente, un 1 % de los ratones recién nacidos resultaron ser transgénicos, y alcanzaban un mayor tamaño



Figura 13-24. Ratón transgénico. Los ratones son hermanos, pero el de la izquierda deriva de un huevo al que se inyectó una construcción con el promotor de la metalotioneína (*MP*) fusionado al gen de la hormona del crecimiento de la rata. El ratón transgénico pesa 44 g, mientras que su hermano no tratado pesa 29 g. El nuevo gen se transmite a la descendencia de modo mendeliano, demostrando que se ha integrado en un cromosoma. (R.L. Brinster.)

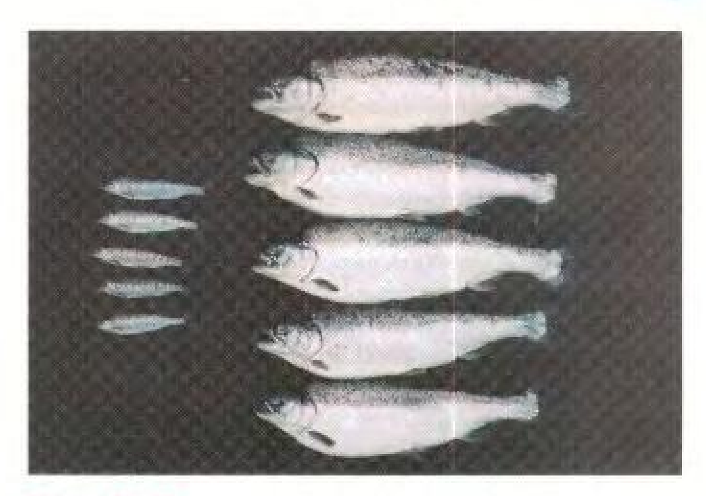


Figura 13-25. Efecto producido en el salmón del Pacífico por la introducción de un complejo transgénico hormonal bajo el control de un promotor fuerte. Todos los salmones que se muestran tienen la misma edad. (R. H. Devlin, T. Y. Yesaki, C. A. Biagi, E. M. Donaldson, P. Swanson y W. K. Chan, «Extraordinary Growth» *Nature* 371,1994, 209-210.)

cuando se les suministraban metales pesados durante el desarrollo. Un ratón transgénico representativo se cruzó con una hembra *lit*/*lit* homocigótica. En la Figura 13-23 se muestra el pedigrí resultante. En esta figura se observa la aparición en las generaciones subsiguientes de ratones con un peso doble o triple que el de sus familiares *lit*/*lit*; puesto que estos ratones son heterocigóticos, el transgén de la hormona del crecimiento de rata actúa como un alelo dominante. Este transgén también provoca un aumento del tamaño de los ratones lit^{+} (Fig. 13-24).

En los mamíferos, el sitio en el que se inserta el DNA introducido es muy variable y no suele encontrarse integrado en el locus homólogo. Por ello, la terapia génica, en la mayoría de los casos, no implica una corrección genuina del problema original, sino más bien un enmascaramiento del mismo.

Se ha utilizado una tecnología similar para generar variedades transgénicas de crecimiento rápido de salmón del Pacífico y los resultados han sido espectaculares. Se microinyectó en huevos de salmón un plásmido portador del gen de la hormona del crecimiento regulado por el promotor de la metalotioneína (ambos derivados del salmón). Una pequeña proporción de los peces resultantes fue transgénica, siendo seleccionados los positivos mediante la comprobación de la presencia de las secuencias plasmídicas en el DNA genómico. Estos peces pesaron por término medio once veces más que los controles no transgénicos (Fig. 13-25). La descendencia heredó el transgén del mismo modo que los ratones en el ejemplo anterior.

Terapia génica humana

Quizás, la aplicación más excitante y polémica de la tecnología de los transgenes es la terapia génica en humanos, es decir, al tratamiento y mejora sintomática de las enfermedades genéticas humanas mediante la adición de genes silvestres exógenos para corregir la función defectuosa de determinadas mutaciones. Hemos visto que el primer caso de terapia génica en mamíferos fue

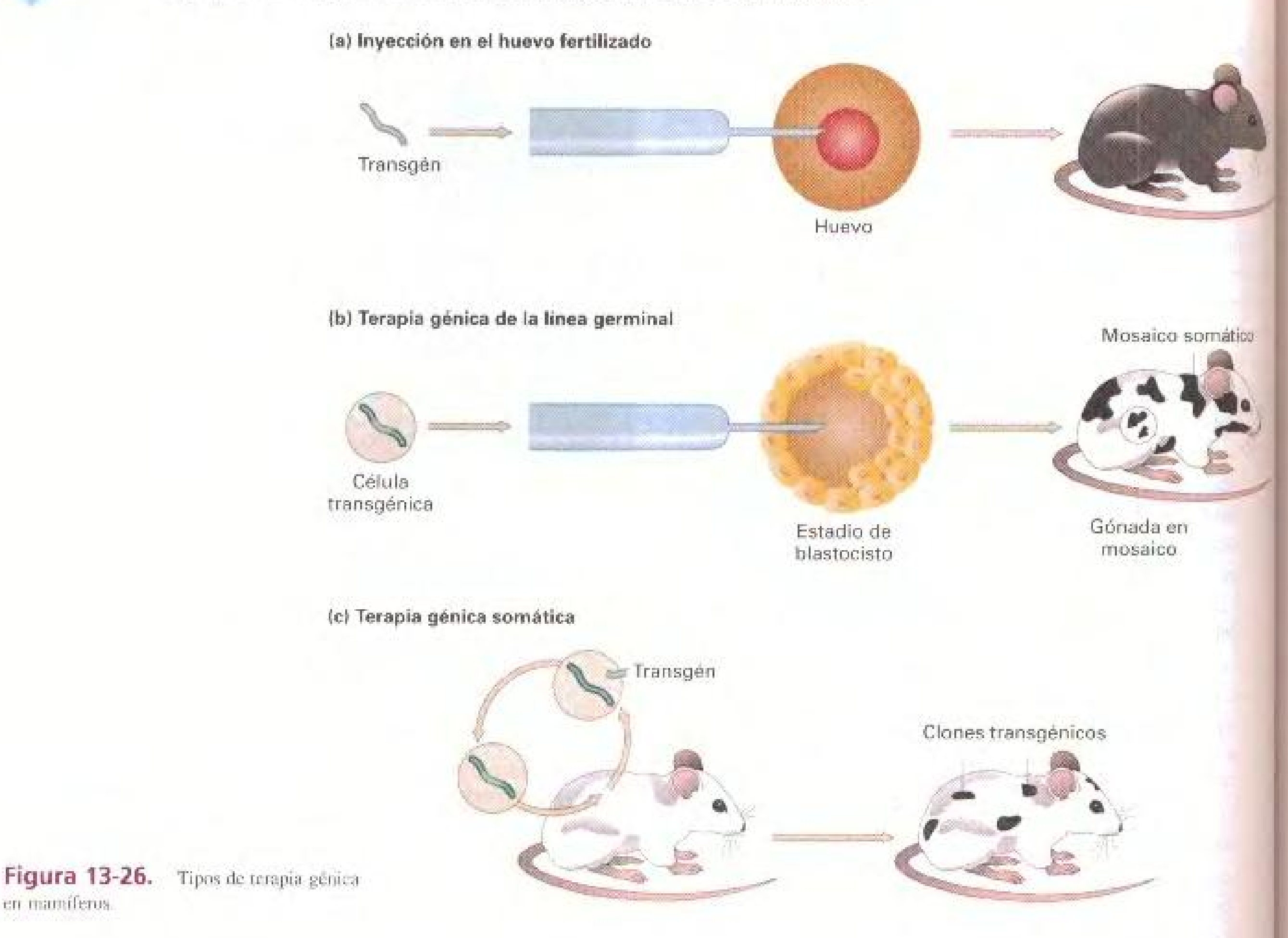


Figura 13-26. Tipos de terapia génica en mamíferos.

la «curación» de un huevo de ratón fertilizado de genotipo enano, mediante la inyección del alelo silvestre que confiere un crecimiento normal. Esta técnica (Fig. 13-26*a*) tiene escasa aplicación en la especie humana, ya que, de momento, es imposible diagnosticar si un huevo fertilizado tiene un genotipo defectuoso sin destruir la célula. (Sin embargo, en un embrión temprano con sólo unas cuantas células, sí es posible extraer una célula para analizarla sin que esto tenga consecuencias nocivas para el resto).

En los seres humanos pueden utilizarse dos tipos básicos de terapia génica, la somática y la germinal. El objetivo de la **terapia génica de la línea germinal** (Fig. 13-26*b*) es el más ambicioso de los dos: introducir células transgénicas en la línea germinal, así como en la población de células somáticas. Con esta terapia no sólo deberíamos conseguir curar a la persona tratada sino que algunos gametos también podrían heredar el genotipo corregido. Hemos visto que este tipo de terapia germinal ya se ha realizado en ratones inyectando en huevos fertilizados. Sin embargo, el protocolo que podría trasladarse a humanos consiste en la extracción de un embrión temprano (blastocisto) con un genotipo defectuoso de una hembra de ratón embarazada y la inyección en el blastocisto de células transgénicas con el alelo silvestre. Estas células llegan a formar parte de muchos tejidos del cuerpo, incluyendo a menudo la línea germinal que dará lugar a las gónadas. Cuando ocurre esto, el gen puede transmitirse a algunos o incluso a todos los descendientes, dependiendo del tamaño del clon de células transgénicas establecido en la línea germinal. Aunque en principio el método es aplicable, hasta la fecha no se ha realizado ningún tipo de terapia génica de la línea germinal en seres humanos.

Hemos visto que la mayoría de los DNA exógenos se integrarán ectópicamente en cualquier lugar del genoma. Esto dificulta la terapia génica humana, no sólo por la posibilidad de que la integración ectópica cause la interrupción de un gen, sino también porque, incluso si se consigue revertir el fenotipo asociado a la enfermedad, el alelo mutante todavía está presente y puede segregarse del transgén en futuras generaciones. Por todo ello para que se pueda conseguir una terapia génica germinal satisfactoria, será necesario desarrollar un método eficaz de sustitución génica, mediante el cual el trangén silvestre sustituya a la copia residente defectuosa por entrecruzamiento doble.

La **terapia génica somática** (Fig. 13-26*c*) se dirige exclusivamente al cuerpo (el soma). La estrategia consiste en intentar corregir el fenotipo de una enfermedad mediante el tratamiento de *algunas* células somáticas de la persona afectada. Por el momento, no es posible conseguir un cuerpo totalmente transgénico, por lo que el método se aplica a la terapia de enfermedades causadas por genes expresados predominantemente en un tejido. En estos casos, es probable que no sea necesario que todas las células de ese tejido sean transgénicas; un porcentaje suficiente de células transgénicas puede aliviar la sintomatología de la enfe-

medad. El método consiste en la extracción de algunas células a partir de un paciente con el genotipo defectuoso para convertirlas en transgénicas mediante la introducción de copias funcionales del gen. Las células transgénicas se reintroducen luego en el cuerpo del paciente, donde aportan la función normal del gen.

Actualmente, existen dos maneras de introducir el transgén en las células somáticas defectuosas. Ambos métodos se basan en la utilización de virus. El método que primero se desarrolló utiliza retrovirus inactivos en cuyo genoma se ha introducido el transgén, sustituyendo a gran parte de los genes virales. El ciclo natural de los retrovirus incluye la integración del genoma viral en algún lugar de los cromosomas de la célula hospedadora. De este modo, el retrovirus recombinante integrará también el transgén que contiene. Este tipo de vectores plantea un problema potencial, puesto que el virus puede actuar como un mutágeno al insertarse e inactivar un gen residente desconocido, provocando una mutación. Otro problema asociado a este tipo de vectores es que los retrovirus atacan sólo a células en proliferación tales como las células sanguíneas. Este procedimiento se ha utilizado para la terapia génica somática de la inmunodeficiencia combinada severa (SCID, del inglés *Severe Combined Immunodeficiency Disease*), también conocida como la *enfermedad del niño burbuja*. Esta enfermedad está causada por una mutación en el gen de la desaminasa de adenosina (ADA), una enzima de la sangre. Para su terapia génica, se extraen las células madre sanguíneas de la médula ósea, se les añade el transgén y las células transgénicas se reintroducen en el sistema circulatorio. En la actualidad, la evolución de estos paciente es buena.

Incluso los tejidos sólidos parecen ser accesibles a la terapia génica somática. En un caso desesperado, se trató con terapia génica a un paciente homocigótico para un alelo mutante recesivo del gen *LDLR*, que cifra el receptor de lipoproteínas de baja densidad (genotipo $LDLR^-/LDLR^-$). Este alelo mutante eleva el riesgo de aterosclerosis y de enfermedades coronarias. Dado que la proteína receptora se sintetiza en las células hepáticas, se extrajo un 15 % del hígado del paciente, se disociaron las células y se infectaron con un retrovirus portador del alelo $LDLR^+$. Las células transgénicas se reintrodujeron en el cuerpo por inyección en la vena porta, que transporta sangre del intestino al hígado. Así, las células transgénicas se establecieron en el hígado. El seguimiento de la evolución del paciente indica que el procedimiento parece haber tenido éxito y el perfil lipídico del paciente ha mejorado.

Los otros vectores utilizados en la terapia génica humana son los adenovirus. Estos virus atacan normalmente a los epitelios respiratorios, inyectando su genoma en las células epiteliales. El genoma viral no se inserta en el cromosoma, sino que se mantiene extracromosómicamente en las células, eliminando así el problema de la aparición de mutaciones asociadas a la integración del vector. Otra ventaja de los adenovirus es que atacan a las células que no se dividen, por lo que la mayoría de los tejidos, en principio, son susceptibles de ser tratados. Dado que la fibrosis quística es una enfermedad del epitelio respiratorio, los adenovirus se presentan como vectores apropiados para su tratamiento. De hecho, ya están siendo utilizados en los primeros intentos de desarrollar una terapia génica para esta enfermedad; los virus portadores del alelo silvestre de la fibrosis quística se introducen a través de la nariz, por medio de un nebulizador. Además, también es posible utilizar adenovirus para infectar células musculares, del hígado y del sistema nervioso.

Un tipo muy prometedor de construcción que debería poder utilizarse en la terapia génica son los cromosomas artificiales humanos (HAC, del inglés *Human Artificial Chromosome*). Los HAC contienen esencialmente los mismos componentes que los YAC. Se construyeron mezclando en disolución DNA telomérico humano, DNA genómico y DNA satélite α repetitivo (con presunta actividad centromérica). A esta mezcla se le añadió lipofectina, una sustancia que permite el paso a través de la membrana, y la mezcla completa se añadió a células en cultivo. Se observó que algunas células contenían pequeños cromosomas nuevos que parecían haber surgido del ensamblaje *de novo* dentro de la célula de los componentes añadidos (Fig. 13-27). Cuando se haya perfeccionado esta tecnología, los HAC deberían servir como vectores de grandes prestaciones, capaces de transferir establemente grandes cantidades de DNA humano a las células.

COROLARIO

La terapia génica introduce células transgénicas en el tejido somático para corregir una función defectuosa (terapia somática) o en la línea germinal para su transmisión a la descendencia (terapia germinal).

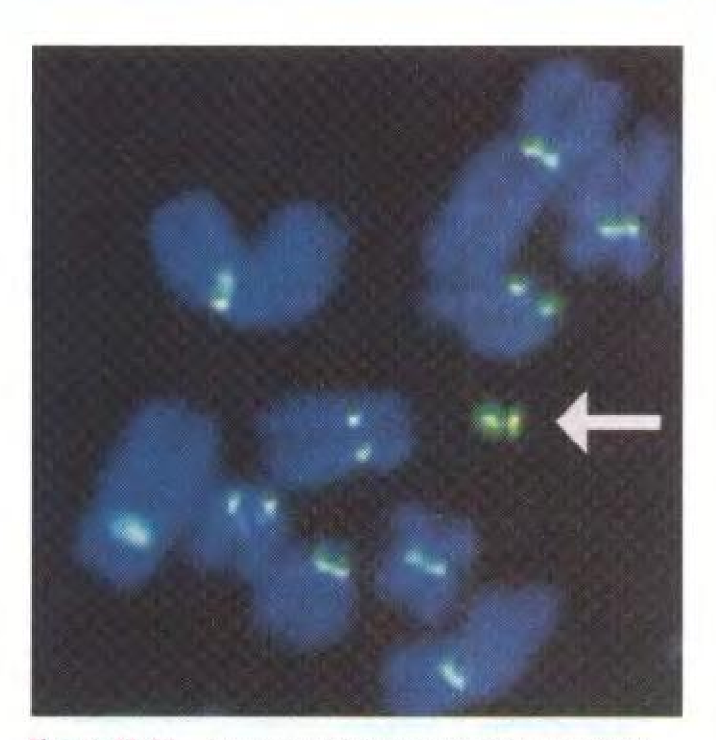


Figura 13-27. Cromosoma artificial humano (señalado con la flecha). (John J. Harrington, G. Van Bokkelen, R. W. Mays, K. Gustashaw y H. F. Willard, «Formation of de Novo Centromeres and Construction of First Generation Human Artificial Microchromosomes», *Nature Genetics* 15, 1997, 345-355. Imagen cedida por cortesía de Athersys Inc. y Case Western Reserve.)

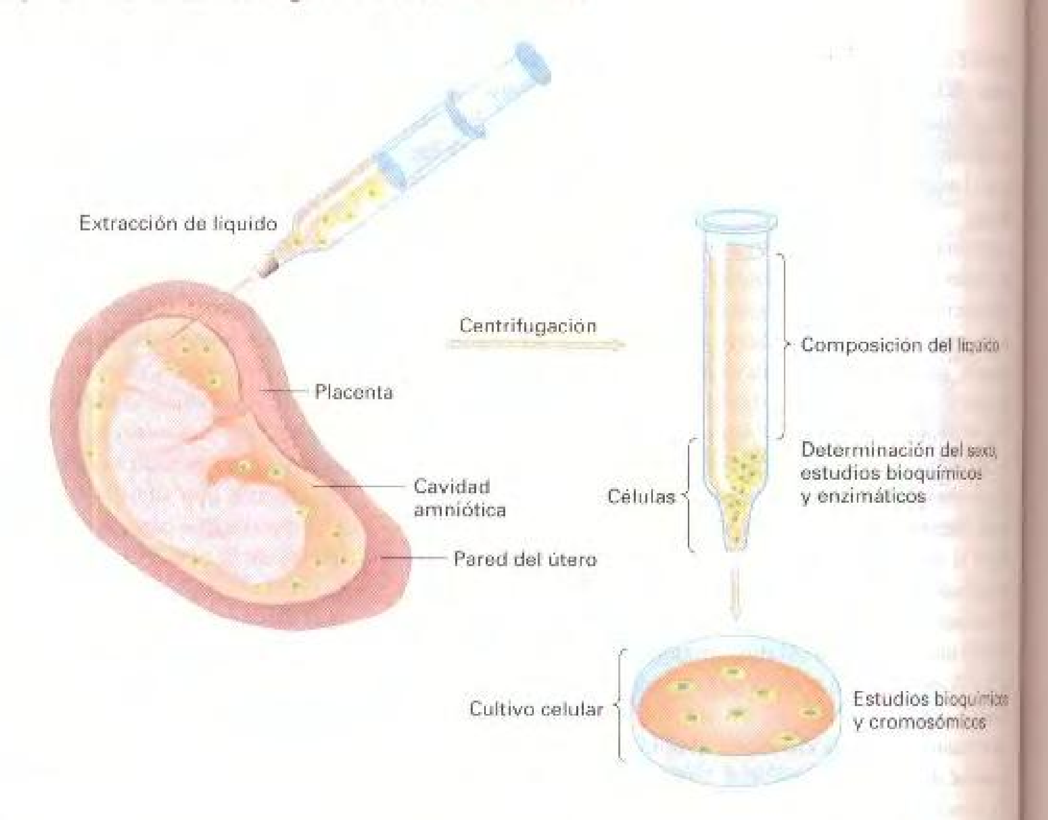


Figura 13-28. Amniocentesis.

Detección directa de los alelos responsables de una enfermedad mediante la tecnología del DNA recombinante

Los fenotipos mutantes recesivos debidos a la herencia de un solo gen son responsables de más de 500 enfermedades humanas. Una persona homocigótica, que resulte del matrimonio entre dos heterocigotos para el mismo alelo recesivo, padecerá la enfermedad. Para permitir la opción de abortar los fetos afectados, pueden analizarse células derivadas del feto en una etapa suficientemente temprana. Actualmente, conocemos muchas de las enzimas u otras proteínas alteradas o ausentes en las enfermedades genéticas (en el Cuadro 9-4 se presenta una lista de defectos congénitos del metabolismo).

CUADRO 13-1. Algunas enfermedades genéticas comunes

Errores congénitos del metabolismo	Incidencia aproximada entre los recién nacidos vivos
Fibrosis quística	1/1600 Caucásicos
Distrofia muscular de Duchenne	1/3000 varones (ligado al X)
Enfermedad de Gaucher (glucocerebrosidasa defectuosa)	1/2500 Judíos Ashkenazi; 1/75 000 otros
Enfermedad de Tay-Sachs (hexosaminidasa A defectuosa)	1/3500 Judíos Ashkenazi; 1/35 000 otros
Pentosuria esencial (benigna)	1/2000 Judíos Ashkenazi; 1/50 000 otros
Hemofilia clásica (factor VIII de coagulación defectuoso)	1/10 000 varones (ligado al X)
Fenilcetonuria (fenilalanina hidroxilasa defectuosa)	1/5000 Irlandeses célticos; 1/15 000 otros
Cistinuria (mutación en un gen desconocido)	1/15 000
Leucodistrofia metacromática (arilsulfatasa A defectuosa)	1/40 000
Galactosemia (galactosa 1-fosfato uridil transferasa defectuosa)	1/40 000
Hemoglobinopatías	**Incidencia aproximada entre los recién nacidos vivos**
Anemia falciforme (cadena de la β-globina defectuosa)	1/400 negros americanos. En algunas poblaciones de África occidental la frecuencia de heterocigotos es del 40 %
β-Talasemia (cadena de la β-globina defectuosa)	1/400 en algunas poblaciones mediterráneas

Nota: aunque la gran mayoría de las más de 500 enfermedades genéticas recesivas conocidas son extremadamente raras, en su conjunto suponen un enorme sufrimiento para la especie humana. Como corresponde a las mutaciones mendelianas, la incidencia de algunas de estas enfermedades es mucho mayor en determinados grupos raciales.

Fuente: J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y D. T. Kurtz, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Scientific American Books. Copyright © 1992 de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y D. T. Kurtz.

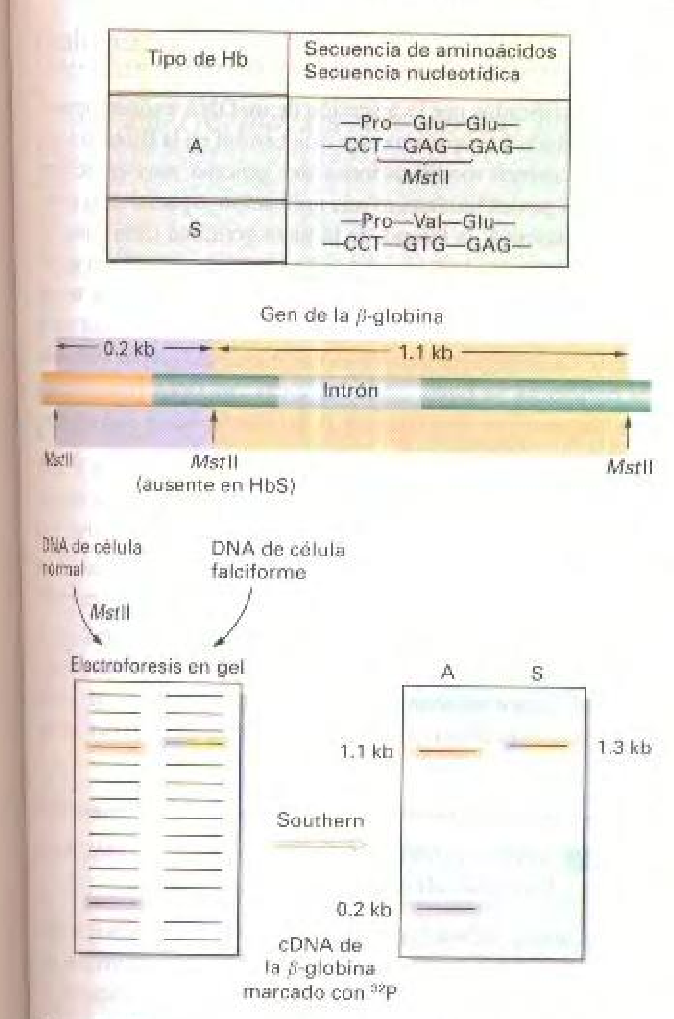


Figura 13-29. Detección del gen de la anemia falciforme por análisis Southern. El cambio de base (A-T) que causa la anemia falciforme elimina un sitio de restricción *MstII* presente en el gen normal de la β-globina. Esta diferencia puede detectarse mediante análisis Southern. (Adaptado de *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Scientific American Books. Copyright © 1992 de James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski y Mark Zoller.)

Para detectar estos defectos genéticos, se extraen células fetales a partir del líquido amniótico, se separan de otros componentes y se cultivan para permitir el análisis de los cromosomas, proteínas, reacciones enzimáticas y otras propiedades bioquímicas. Este proceso, denominado **amniocentesis** (Fig. 13-28), permite la identificación de varias enfermedades conocidas; el Cuadro 13-1 muestra algunos ejemplos. La toma de **muestras de las vellosidades coriónicas** (CVS, del inglés *Chorionic Villus Sampling*) es una técnica relacionada, en la que una muestra pequeña de células de la placenta se aspira con una jeringa larga. Esta prueba puede realizarse durante el embarazo antes que la amniocentesis, que debe esperar hasta que se haya desarrollado un volumen suficiente de fluido amniótico.

La detección de trastornos mediante el análisis de las propiedades fisiológicas o las actividades enzimáticas de células fetales cultivadas está limitada a las enfermedades que afectan a caracteres o proteínas que se expresan en las células cultivadas. Sin embargo, la tecnología del DNA recombinante ha mejorado la detección prenatal de las enfermedades genéticas, puesto que el DNA puede analizarse directamente. En principio, el gen que se desea analizar podría clonarse para comparar su secuencia con la del alelo silvestre. Sin embargo, este procedimiento sería tedioso y poco práctico, por lo que han de diseñarse «atajos» para acelerar el proceso de análisis. En esta sección se explican varias de las técnicas útiles que se han desarrollado con este objetivo.

Alteración de una diana de restricción por mutación

La anemia falciforme es una enfermedad genética causada por una mutación bien caracterizada. La enfermedad afecta a aproximadamente un 0.25 por ciento de los afroamericanos y está provocada por una alteración de la hemoglobina, que consiste en la sustitución del aminoácido valina por el ácido glutámico en la posición 6 de la cadena de la β-globina. El cambio de GAG a GTG elimina un sitio de corte para la enzima de restricción *MstII*, que corta la secuencia CCTNAGG (donde N representa cualquiera de las cuatro bases). El cambio de CCTGAGG a CCTGTGG puede entonces reconocerse por análisis Southern utilizando cDNA marcado de la β-globina como sonda, ya que el DNA de los enfermos de anemia falciforme carecerá de un fragmento presente en las personas sanas y, en cambio, contendrá un fragmento de mayor tamaño (no cortado) que está ausente en las personas sanas (Fig. 13-29).

Detección de secuencias alteradas con sondas específicas

Cuando una enfermedad genética puede atribuirse a un cambio en un nucleótido específico, podemos identificar el cambio utilizando oligonucleótidos sintéticos como sondas. El mejor ejemplo es la deficiencia de la α_1-antitripsina, que aumenta notablemente la probabilidad de desarrollar enfisemas pulmonares. La enfermedad surge por el cambio de un solo nucleótido en una posición conocida. Se puede utilizar como sonda un oligonucleótido sintético correspondiente a la secuencia silvestre de la región de interés para determinar mediante la técnica Southern si el DNA contiene la secuencia silvestre o la mutante. A temperaturas elevadas, una secuencia que sea perfectamente complementaria hibridará, mientras que una secuencia que contenga incluso un solo nucleótido mal emparejado no lo hará.

Análisis por PCR

Puesto que la PCR permite al investigador identificar una secuencia de DNA potencialmente defectuosa, puede utilizarse con éxito en el diagnóstico de enfermedades asociadas a la presencia de un sitio mutante específico. Se utilizan oligonucleótidos que abarquen dicho sitio y el DNA amplificado se secuencia o se compara con el silvestre por otros métodos.

Ya hemos tratado la detección de RFLP ligados como un método más indirecto para la diagnosis de la presencia de un alelo mutante.

COROLARIO

La tecnología del DNA recombinante ofrece una serie de técnicas sensibles para la detección de alelos mutantes tanto de individuos como de embriones *in útero*.

RESUMEN

Los genes clonados pueden modificarse introduciendo mutaciones específicas en sitios concretos mediante la utilización de las técnicas de mutagénesis dirigida. Los RFLP son marcadores útiles en la cartografía cromosómica. El ligamiento de un RFLP a un gen causante de una enfermedad humana se utiliza para aconsejar a los futuros padres y en el diagnóstico de la enfermedad *in útero*. La Genética inversa parte de un gen o de una proteína de función desconocida, induce un cambio específico, como puede ser la interrupción del gen, y luego analiza las consecuencias fenotípicas para intentar entender la función del gen. La Biotecnología es la aplicación de las técnicas del DNA recombinante para modificar animales, plantas y microorganismos importantes desde un punto de vista comercial. Los organismos transgénicos, modificados por la inserción de un DNA exógeno concreto, han pasado a ocupar una posición central en la Biotecnología porque permiten modificaciones del genoma muy específicas. La terapia génica humana es una aplicación especial de la tecnología transgénica: la terapia de la línea germinal tiene como objetivo incorporar algunas células transgénicas en la línea germinal para que sean transmitidas a la descendencia; la terapia somática introduce células modificadas genéticamente en el cuerpo. La amniocentesis y la toma de muestras de las vellosidades coriónicas se basan en las técnicas del DNA recombinante para diagnosticar directamente la presencia de un alelo responsable de una enfermedad.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

DNA recombinante / sonda / hibridación *in situ* / terapia génica / RFLP / transgénico / cartografía / mutagénesis *in vitro* / examen genético

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

En el Capítulo 2 vimos cómo los pedrigríes pueden servirnos para trazar la historia genética de una familia, y en el Capítulo 12 examinamos la técnica Southern. Podemos incorporar estas ideas a los conceptos que hemos descrito en este capítulo acerca del análisis de las enfermedades genéticas humanas. La enfermedad de Huntington (HD, del inglés *Huntington's Disease*) es un trastorno neurodegenerativo letal que se hereda de forma autosómica dominante. Dado que la aparición de los síntomas se produce generalmente a una edad tardía (entre los 30 y los 50 años), los afectados de HD suelen haber tenido ya descendencia y algunos de los hijos heredan la enfermedad. Hasta muy recientemente no se había conseguido ningún método fiable de diagnóstico presintomático, pero un equipo de científicos ha encontrado una sonda (denominada G8) que detecta un polimorfismo de DNA (exactamente un tetramorfismo) asociado a la enfermedad. La sonda y los cuatro tipos de fragmentos de DNA que reconoce se muestran a continuación; las líneas verticales representan sitios de restricción para la enzima *Hin*dIII:

Región homóloga a la sonda G8

17.5	3.7	1.2	2.3	8.4	DNA A
17.5	4.9		2.3	8.4	DNA B
15	3.7	1.2	2.3	8.4	DNA C
15	4.9		2.3	8.4	DNA D

a. Dibuje los resultados esperados de un análisis Southern de células de individuos homocigóticos (*A*/*A*, *B*/*B*, *C*/*C* y *D*/*D*) y de todas las posibles combinaciones de heterocigotos (*A*/*B*, *A*/*C* y demás). ¿Son todos ellos diferentes?

b. ¿A qué se deben las diferencias en el DNA en cuanto a las dianas de restricción? ¿Podríamos decir si estas diferencias son triviales o potencialmente adaptativas? Razone la respuesta.

c. Cuando se estudiaron líneas celulares híbridas humano-ratón, la sonda G8 se unió sólo a secuencias del DNA del cromosoma 4 humano. ¿Cómo puede explicarse este resultado?

d. Dos familias con casos de HD (una de Venezuela y otra de Estados Unidos) están siendo analizadas para determinar su genotipo en la región G8. Los resultados se muestran en los pedigríes de la figura de la página siguiente, donde los casos de HD se representan con símbolos en negro y las barras indican individuos fallecidos antes de 1983. ¿Qué relaciones de ligamiento pueden deducirse? ¿Qué podemos inferir de dichas relaciones?

e. Un individuo de 20 años perteneciente a la familia venezolana necesita consejo genético. ¿Qué pruebas podríamos hacerle y qué consejo daríamos en cada caso? ¿Y para la familia norteamericana?

f. ¿Cómo podríamos utilizar estos datos para caracterizar el defecto causante de la HD?

g. ¿Podríamos utilizar estos resultados para dar consejo genético a otras familias?

h. ¿Podemos encontrar individuos atípicos en estos pedigríes? Si es así, identifíquelos.

Solución

a.

	A/A	B/B	C/C	D/D	A/B	A/C	A/D	B/C	B/D	C/D
17.5	—	—			—	—	—	—	—	
15.0			—	—		—	—	—	—	—
8.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4.9		—		—	—		—	—	—	—
3.7	—		—		—	—	—	—		—
2.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.2	—		—		—	—	—	—		—

A/D y B/C son idénticos, y el resto diferentes.

b. Las diferencias en los patrones de restricción son consecuencia de diferencias en la secuencia del DNA. No existen pruebas suficientes para catalogar estas diferencias como triviales o potencialmente adaptativas.

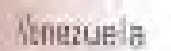
c. La secuencia a la que corresponde la sonda G8 se localiza en el cromosoma 4.

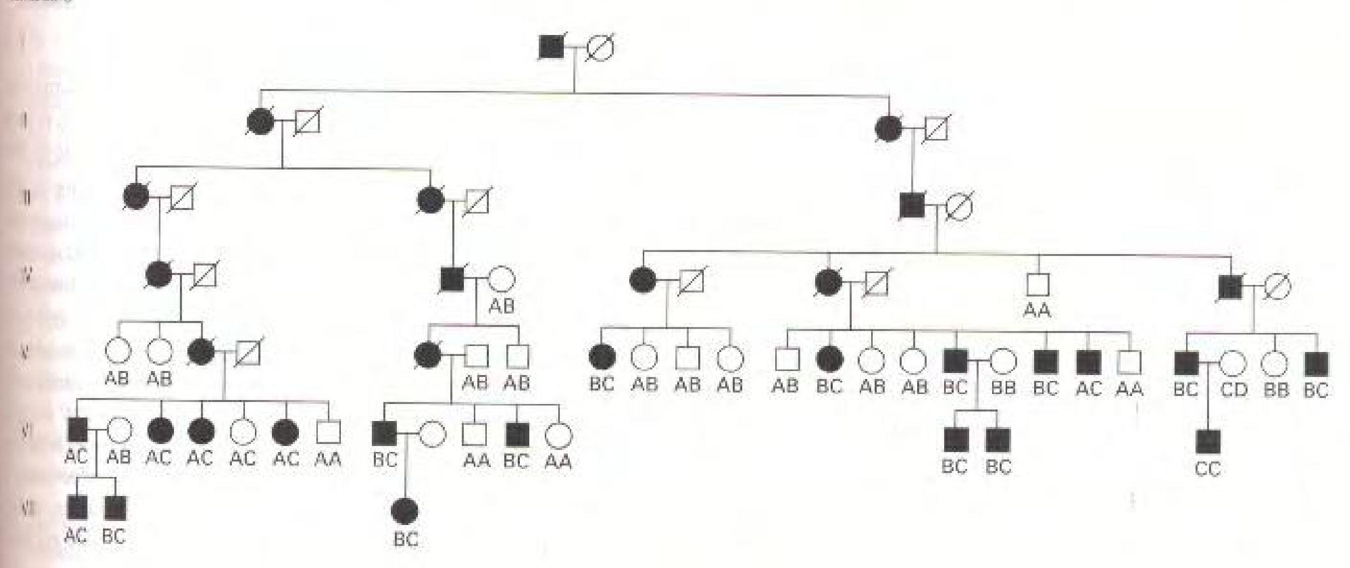
d. En la familia venezolana, la enfermedad está fuertemente asociada al morfo *C* del RFLP, lo que sugiere un estrecho ligamiento entre ambos. En la familia nortemericana existe una asociación más débil de la enfermedad con el morfo *A* que, sin embargo, también sugiere la existencia de ligamiento. La diferencia entre ambas familias puede explicarse por variación estadística.

e. En ambos casos, se debería analizar el polimorfismo en cuestión digiriendo el DNA con *Hin*dIII e hibridándolo con la sonda G8.

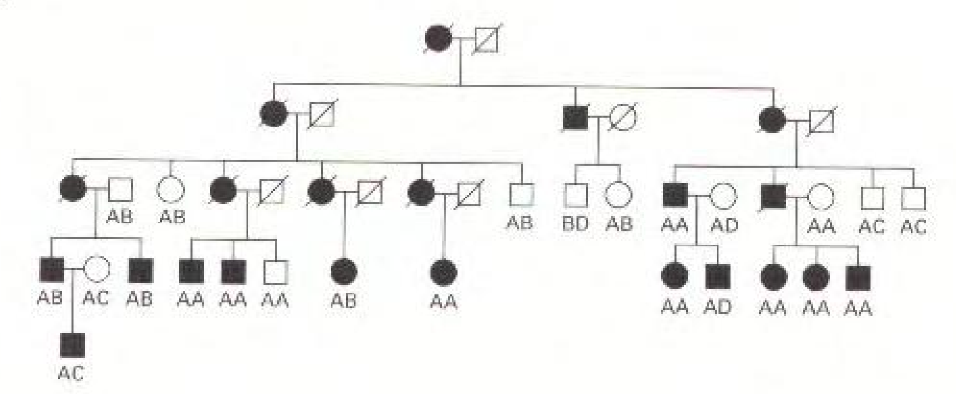
En la familia venezolana, encontramos un individuo recombinate (VI-5) entre los 20 portadores del morfo *C*. Esto quiere decir que la sonda G8 se encuentra a 100 % (1/20) = 5 u.m. de distancia del gen responsable de la HD. Si la persona que nos pidió consejo es portadora del morfo *C*, tiene un 95 % de posibilidades de tener el alelo causante de la enfermedad y un 5 % de no tenerlo. Si por el contrario, no presenta el morfo *C*, el porcentaje se invierte: 5 % de tener el alelo de la enfermedad y 95 % de no tenerlo.

La situación en la familia norteamericana no es tan clara como en la de Venezuela. En la familia estadounidense, el polimorfismo *A* está presente en cuatro individuos sin antecedentes familiares de la enfermedad de Huntington que se casaron con miembros de la familia afectada. Su presencia hace imposible la identificación de individuos recombinantes con total seguridad. Podemos asumir que la sonda G8 detecta un polimorfismo que se encuentra a unas 5 u.m. del locus del Huntington, basándonos en los resultados de la familia de Venezuela. Sin embargo, las conclusiones


Venezuela



Estados Unidos



que podríamos sacar de las pruebas realizadas en el individuo en cuestión dependerían del genotipo de su progenitor afectado.

Por ejemplo, si el progenitor afectado fuera *AA* y el individuo en cuestión portara algún A^-, la probabilidad de que esta persona hubiera heredado el gen de la enfermedad sería del 50 %. En otro caso, si el padre afectado fuera *AD* y el individuo en cuestión portara también A^-, la posibilidad de haber heredado el gen de la HD sería del 95 %, a menos que el padre sano también portara *A*. En este caso, el riesgo sería del 50 %.

f. La sonda G8 puede servirnos para identificar la región cromosómica que contiene el gen de la enfermedad de Huntington, y así abordar su clonación posicional. Una vez clonado, el gen puede transcribirse y traducirse para identificar su producto proteico.

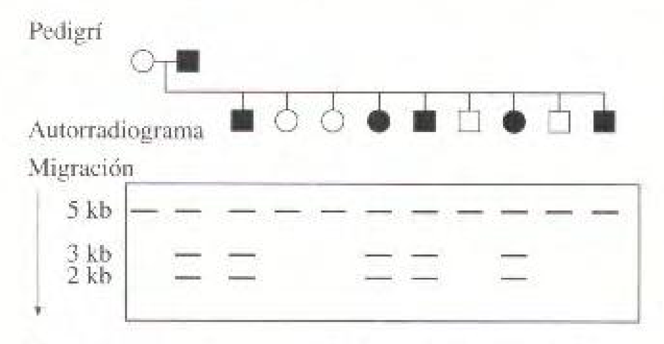
g. Para ello, la familia debería mostrar este RFLP. Después tendríamos que establecer el ligamiento de la HD a uno de los morfos.

h. Se identificó un individuo atípico en la familia venezolana, VI-5, recombinante entre el morfo ligado y el gen del Huntington. En la familia norteamericana no puede determinarse que un individuo sea obligatoriamente recombinante.

(Solución de Diane K. Lavett)

PROBLEMAS RESUELTOS

1. Se realizan pruebas de DNA a una familia numerosa en la que algunos miembros están afectados de una determinada enfermedad autosómica dominante de manifestación tardía (aproximadamente a los 40 años). Se digiere una muestra de DNA de cada miembro de la familia con la enzima de restricción *Taq*I y se somete a electroforesis. El DNA se analiza mediante la técnica de Southern con una sonda marcada que consiste en un fragmento de DNA humano clonado en un plásmido bacteriano. Se muestra el autorradiograma correspondiente a cada miembro del pedigrí. Los individuos afectados se indican en negro.



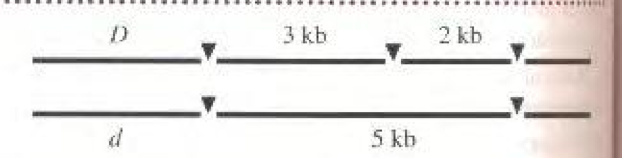
a. Analice la relación entre la variación en el DNA, la sonda de DNA y el gen responsable de la enfermedad, dibujando las regiones cromosómicas relevantes.

b. ¿Cómo puede explicarse el último hijo?

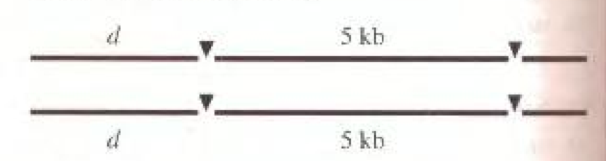
c. ¿Qué utilidad tendrían estos resultados para ofrecer consejo genético a miembros de esta familia que se vayan a casar?

♦ Solución ♦

a. La sonda detecta tres bandas de 5, 3 y 2 kb. Todos los miembros de la familia presentan la banda de 5 kb. Cinco de las seis personas afectadas presentan las bandas de 3 y 2 kb, mientras que ninguna de las personas sanas las presentan; por consiguiente, es probable que estos fragmentos estén ligados al alelo responsable de la enfermedad. Puesto que 3 + 2 = 5, una disposición probable en el padre es la siguiente, donde el alelo *D* es el alelo defectuoso y la flecha representa el sitio de restricción:



En la madre, es la siguiente:



b. El último hijo es muy probable que resulte de un entrecruzamiento entre el alelo responsable de la enfermedad y el locus RFLP, dando lugar a un cromosoma con *D* y el fragmento de 5 kb.

c. Puesto que los fragmentos de 3 y 2 kb están ligados al alelo responsable de la enfermedad, la presencia de estos fragmentos puede utilizarse con fines diagnósticos. Sin embargo, la diagnosis tiene que considerar la posibilidad de que ocurran entrecruzamientos.

2. Se utiliza un plásmido de levaduras portador del alelo $leu2^+$ para transformar células haploides $leu2^-$ incapaces de revertir. Tras sembrar en un medio sin leucina, se obtienen varias colonias leu^+ que presumiblemente habrán incorporado el alelo $leu2^+$, aunque hay que averiguar qué ha pasado con él dentro de las células. Mediante cruzamientos entre los transformantes y células $leu2^-$ se distinguen tres tipos de transformantes, A, B y C, indicativos de que el alelo $leu2^+$ se ha incorporado mediante tres vías diferentes. Los resultados son:

Tipo A × $leu2^-$ ⟶ $\frac{1}{2}\,leu^-$
⟶ $\frac{1}{2}\,leu^+$, × $leu2^+$ estándar
⟶ $\frac{3}{4}\,leu^+$
$\frac{1}{4}\,leu^-$

Tipo B × $leu2^-$ ⟶ $\frac{1}{2}\,leu^-$
⟶ $\frac{1}{2}\,leu^+$, × $leu2^+$ *estándar*
⟶ 100 % leu^+
0 % leu^-

Tipo C × $leu2$ ⟶ 100 % leu^+

¿Qué tres destinos diferentes para el alelo *leu2*⁺ sugieren estos resultados? Proponga hipótesis que expliquen *todos* los resultados, utilizando diagramas, si es posible.

♦ Solución ♦

Si el plásmido de levaduras no se integra, entonces se replicará independientemente de los cromosomas. Durante la meiosis, los plásmidos hijos serán distribuidos a las células hijas, dando lugar a un 100 % de transmisión. Este porcentaje es el que se observó para el transformante de tipo C.

Si se integra una copia del plásmido, en un cruzamiento con una línea $leu2^-$, la descendencia segregará como 1 leu^+:1 leu^-. Esta es la proporción que se observa en los tipos A y B.

Cuando las células leu^+ resultantes se cruzan con la línea $leu2^-$ estándar, los resultados obtenidos con las células de tipo A sugieren que el gen insertado está segregando independientemente del locus $leu2^+$ normal, de lo que se concluye que el transgén $leu2^+$ se ha insertado ectópicamente en otro cromosoma.



Cuando una célula con esta configuración se cruza con la estirpe silvestre normal,

$leu2^+$

se obtienen los siguientes resultados:

$\frac{1}{2}\, leu2^- \to \frac{1}{2}\, leu2^+ \to \frac{1}{4}\ +$

$\qquad\quad\ \to \frac{1}{2}$ sin alelo $\to \frac{1}{4}\ -$

$\frac{1}{2}\, leu2^+ \to \frac{1}{2}\, leu2^+ \to \frac{1}{4}\ +$

$\qquad\quad\ \to \frac{1}{2}$ sin alelo $\to \frac{1}{4}\ -$

Los datos de las células de tipo B sugieren que el gen insertado ha sustituido al alelo $leu2^+$ en su locus normal.

Tipo B $leu2^+$

Cuando se cruce con una estirpe silvestre normal, toda la descendencia sera leu^+.

PROBLEMAS

1. Se han obtenido plantas de tabaco transgénicas, utilizando como vector un plásmido **Ti** diseñado para insertar el gen de interés y un marcador adyacente de resistencia a kanamicina. Se analizó la transmisión de la inserción cromosómica examinando la resistencia a kanamicina de los descendientes y se observaron dos tipos de comportamientos básicos, ejemplificados por las plantas 1 y 2. Cuando la planta 1 se cruzó con una planta silvestre, un 50 % de los descendientes mostraron resistencia a kanamicina, mientras que el otro 50 % fueron sensibles. Cuando la planta 2 se cruzó con una planta silvestre, un 75 % de la descendencia resultó ser resistente a kanamicina y el 25 % restante fue sensible. ¿En qué se diferencian las dos plantas transgénicas? ¿Qué podríamos predecir en cada caso sobre la situación del gen de interés?

2. En *Neurospora*, un organismo con siete cromosomas, se han obtenido las siguientes reorganizaciones cromosómicas en diferentes estirpes:

   a. Una inversión paracéntrica en el cromosoma 1 (el más grande).

   b. Una inversión pericéntrica en el cromosoma 1.

   c. Una translocación recíproca en la que aproximadamente la mitad del cromosoma 1 se ha intercambiado con aproximadamente la mitad del cromosoma 7 (el más pequeño).

   d. Una translocación unidireccional, en la que parte de un cromosoma se ha insertado en otro cromosoma

   e. Una disomía ($n + 1$).

   f. Una monosomía ($2n - 1$).

   g. Una duplicación en tándem de gran parte del cromosoma 1.

   Se ha aislado DNA de todas las estirpes y de una estirpe silvestre, intentando evitar que ocurran roturas mecánicas de los cromosomas, y se ha sometido a electroforesis de campo pulsante ¿Qué bandas esperaríamos observar en cada caso?

3. Hemos clonado un gen de una planta implicado en la fotosíntesis en un vector bacteriano, y queremos averiguar si el gen es activo en raíces y otros tejidos no fotosintéticos ¿Cómo podríamos hacerlo? Describa, lo mejor que le sea posible, los detalles experimentales.

4. Disponemos de dos sondas que detectan dos RFLP situados a unas 20 u.m. en el cromosoma 5 de *Neurospora*. Cuando se digiere DNA de la estirpe 1 con *Pst*I y se analiza mediante la técnica de Southern, la sonda A detecta dos bandas de 1 y 2 kb, y la sonda B detecta una banda de 4 y 1,5 kb. Si repetimos el análisis en la estirpe 2, la sonda A detecta una banda de 3 kb, y la sonda B una banda de 5.5 kb. Dibuje las bandas que esperaríamos observar cuando se analiza con ambas sondas DNA obtenido de cultivos de ascosporas individuales y digerido con *Pst*I. Asegúrese de especificar cuántos tipos de ascas diferentes esperaríamos, teniendo en cuenta que pueden ocurrir entrecruzamientos.

5. En un determinado pedigrí, una mutación que provoca fibrosis quística se debe a un solo cambio de base. Este cambio destruye una diana *Eco*RI que normalmente se encuentra en esta posición ¿Cómo podríamos utilizar esta información para aconsejar a los miembros de esta familia

sobre la posibilidad de que sean portadores? Especifique qué experimentos serían necesarios. Supongamos que se detecta que una mujer de la familia es portadora y está casada con un hombre no emparentado que también es heterocigótico para la fibrosis quística, pero en su caso, es una mutación diferente en el mismo gen ¿Qué consejos daría a la pareja sobre el riesgo de tener descendencia con fibrosis quística?

6. Hemos secuenciado un fragmento de DNA silvestre de levadura que claramente contiene un gen, pero no sabemos cuál. Para indagar sobre la función de este gen, nos gustaría averiguar su fenotipo mutante. ¿Cómo podríamos hacerlo partiendo del alelo silvestre clonado? Especifique con claridad los pasos a seguir.

7. ¿Cómo podríamos utilizar la electroforesis de campo pulsante para averiguar en qué cromosoma está situado un gen que hayamos clonado?

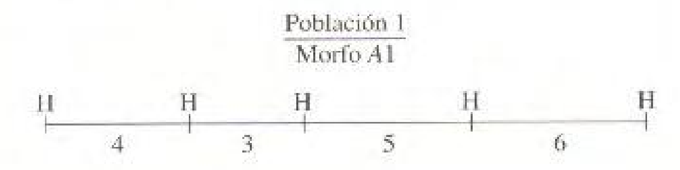
8. La glucuronidasa bacteriana convierte un sustrato incoloro denominado X-Gluc en un pigmento de color azul intenso. El gen de la glucuronidasa también funciona en los vegetales si se coloca bajo el control de un promotor de plantas. ¿Cómo podríamos utilizar este gen para averiguar en qué tejidos se expresa un gen de plantas que se acaba de clonar? (Suponemos que los tejidos vegetales incorporan X-Gluc fácilmente.)

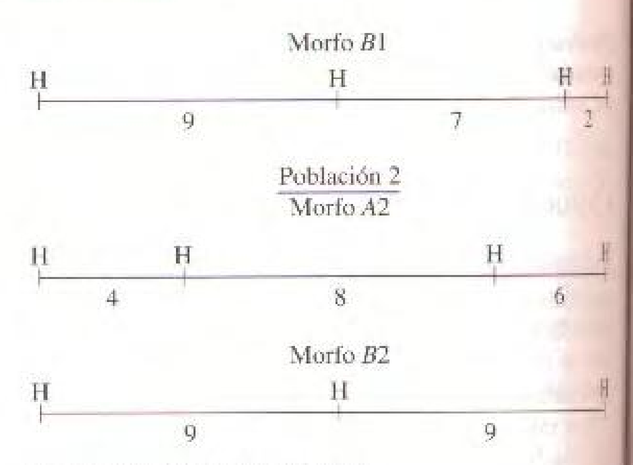
9. Una sonda determinada detecta un RFLP con dos alelos alternativos de 1.7 y 3.8 kb en DNA de ratón digerido con *Hin*dIII. Un ratón heterocigótico para un alelo dominante que provoca un fenotipo de cola curvada y para el RFLP descrito se cruza con un ratón silvestre que muestra sólo el fragmento de 3.8 kb. Un 40 % de la descendencia con cola curvada son homocigotos para el alelo de 3.8 kb y un 60 % son heterocigóticos para los alelos de 3.8 y 1.7 kb.

a. ¿Está ligado el locus que causa la cola curvada al locus del RFLP? Dibuje los cromosomas parentales y los de la descendencia para explicar su respuesta.

b ¿Qué alelos del RFLP esperaríamos entre los descendientes de fenotipo silvestre y en qué proporciones?

10. En un estudio de dos poblaciones haploides de levadura diferentes se utilizan las sondas A y B para detectar RFLP. En la población 1, el gen *A* produce el morfo *A1* y el gen *B* produce el morfo *B1*; en la población 2, el gen *A* produce *A2* y el gen *B*, *B2*. Estos morfos se distinguen por los fragmentos *Hin*dIII rezconocidos por la sonda (el tamaño es en kilobases).





H = diana de restricción *Hin*dIII

Se examinan los productos meióticos y se analizan los fragmentos de DNA que hibridan con las sondas A y B para cada tipo:

		DNA (Fragmentos *Hin*dIII)	
Tipo de espora	Porcentaje	Sonda A	Sonda B
1	15%	4, 3, 5, 6	9, 9
2	15%	4, 8, 6	9, 7, 2
3	35%	4, 3, 5, 6	9, 7, 2
4	35%	4, 8, 6	9, 9

a. ¿Cuál es el origen de los diferentes DNA de las esporas?

b. Dibuje la región o regiones cromosómicas pertinentes

(Problema 10, cortesía de Joan McPherson.)

11. Se ha transformado la planta *Arabidopsis thaliana* con un plásmido Ti en el que se ha insertado el gen de resistencia a la kanamicina en la región del T-DNA. Se han seleccionado dos colonias resistentes a kanamicina (A y B) y se han regenerado plantas a partir de ellas. Tras permitir que las plantas se autofecunden, se han obtenido los siguientes resultados:

Autofecundación de la planta A ⟶ $\frac{3}{4}$ descendencia resistente a kanamicina
$\frac{1}{4}$ descendencia sensible a kanamicina

Autofecundación de la planta B ⟶ $\frac{15}{16}$ descendencia resistente a kanamicina
$\frac{1}{16}$ descendencia sensible a kanamicina

a. Dibuje los cromosomas implicados en ambas plantas

b. Explique las diferencias en los patrones de segregación.

12. Se han utilizado dos plásmidos circulares de levadura diferentes (YP1 e YP2) para transformar células leu^- a leu^+. Los cultivos leu^+ resultantes de ambos experimentos

han cruzado con células leu^- de tipo sexual opuesto. Se obtuvieron los siguientes resultados:

YP1 leu^- × leu ⟶ todos los descendientes son leu^- y sus DNA hibridan con una sonda específica del vector YP1

YP2 leu^+ × leu^- ⟶ $\frac{1}{2}$ de los descendientes son leu^- y sus DNA hibridan con una sonda específica del vector YP2
$\frac{1}{2}$ de los descendientes son leu^- y sus DNA no hibridan con una sonda específica del vector YP2

a. Explique las diferencias de comportamiento entre estos dos plásmidos durante la transformación.

b. Se extrae el DNA total de células transformadas con YP1 e YP2 y se digiere con una enzima que corta una vez dentro del vector (y no corta en el inserto). Si sometemos estas digestiones a electroforesis y análisis Southern, utilizando el plásmido específico como sonda en cada caso, ¿qué resultados podríamos predecir?

13. Un plásmido lineal de 9 kb de *Neurospora*, el plásmido mar1, parece ser un «pasajero» neutro, ya que no causa daños aparentes en su hospedador. Su mapa de restricción es el siguiente:

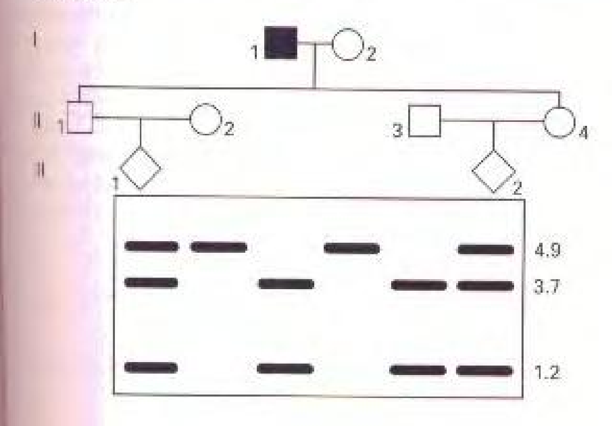
BglII — *XbaI* — *BglII*

Sin embargo, se sospechaba que este plásmido se integra a veces en el DNA genómico. Para comprobar esta idea, se clonó el fragmento central *BglII* en un vector pUC, y se utilizó esta construcción como sonda para el análisis por la técnica Southern del DNA genómico digerido con *XbaI*, procedente de una estirpe portadora de mar1. Describa cómo sería el autorradiograma en los siguientes supuestos:

a. El plásmido nunca se integra.

b. El plásmido se integra ocasionalmente en el DNA genómico.

14. El pedigrí siguiente pertenece a un hombre afectado de la forma transmitida de modo dominante de la enfermedad Huntington.



Dos de sus hijos con riesgo de padecer la enfermedad han optado por el diagnóstico prenatal, aunque no desean ser evaluados ellos mismos. Se ha analizado con la técnica de Southern un sistema de dos alelos (con fragmentos alélicos de 4.9 kb o de 3.7 y 1.2 kb respectivamente) que muestra un 4 % de recombinación con el alelo responsable de la enfermedad. Para cada una de las muestras fetales analizadas, calcule la probabilidad de que el feto herede el alelo causante de la enfermedad. (El problema 14 es cortesía de Steve Wood.)

15. Un genetista que trabaja con *Neurospora* está interesado en los genes que controlan la extensión de las hifas y decide clonar algunos de estos genes. De estudios previos se sabe que un mutante común presenta una morfología de colonia pequeña («colonial») cuando se crece en placas de Petri, un fenotipo debido a la extensión anormal de las hifas. Decide entonces realizar un experimento de búsqueda de mutantes señalizados que presenten el fenotipo colonial mediante mutagénesis insercional. Transforma células de *Neurospora* con un plásmido bacteriano portador de un gen de resistencia a benomilo (*ben-R*) y obtiene colonias resistentes al compuesto. Algunas muestran el fenotipo colonial buscado, así que las aísla y analiza una muestra. Entre las colonias de fenotipo colonial se observan dos tipos:

Tipo 1 *col · ben-R* × silvestre (+ · *ben-S*)
Descendencia $\frac{1}{2}$ *col · ben-R*
$\frac{1}{2}$ + · *ben-S*

Tipo 2 *col · ben-R* × silvestre (+ · *ben-S*)
Descendencia $\frac{1}{4}$ *col · ben-R*
$\frac{1}{4}$ *col · ben-S*
$\frac{1}{4}$ + · *ben-R*
$\frac{1}{4}$ + · *ben-S*

a. Explique la diferencia entre estos dos tipos de resultados.

b. ¿Cuál de los dos tipos debería utilizar el investigador para intentar clonar los genes que afectan a la extensión de las hifas?

c. ¿Cómo debería llevar a cabo la mutagénesis insercional para señalizar estos genes?

d. Si dispusiera de una sonda específica del plásmido bacteriano, ¿qué descendientes debería analizar con esta sonda?

El problema paso a paso

1. ¿En qué consiste la extensión de las hifas y por qué cree que podría ser interesante su estudio?

2. ¿Cómo encaja la estrategia de este experimento en la estrategia genética general de la disección de mutantes?

3. ¿Es *Neurospora* haploide o diploide? ¿Tiene interés para el problema?

4. ¿Es adecuado transformar un hongo (un organismo eucariótico) con un plásmido bacteriano? ¿Tiene importancia cuál sea el origen del plásmido?

5. ¿Qué es la transformación? ¿Qué utilidad tiene en el área de la Genética molecular?

6. ¿Cómo se preparan las células para la transformación?

7. ¿Cuál es el destino del DNA transformante cuando ocurre la transformación?

8. Dibuje la entrada de un plásmido en una célula hospedadora, y una representación de un transformante estable.

9. ¿Modifica en algo el protocolo saber qué es el benomilo? ¿Qué papel juega en el experimento el gen de resistencia a benomilo? ¿Funcionaría el experimento si se utilizara otro marcador de resistencia?

10. ¿Qué significado tiene la palabra *colonial* en este contexto? ¿Por qué consideró el investigador que la búsqueda y caracterización de las mutaciones con este fenotipo contribuiría a la comprensión del proceso de extensión de las hifas?

11. ¿A qué tipo de «experimentos de mutagénesis previos» podemos estar refiriéndonos?

12. Dibuje la apariencia de una placa de Petri típica después de la transformación y la selección. Prestando especial atención a la apariencia de las colonias.

13. ¿En qué consiste la señalización o etiquetado de los genes? ¿Qué relación tiene con la mutagénesis por inserción? ¿Cómo se producen las mutaciones por inserción?

14. ¿Cómo se realizan los cruzamientos y el aislamiento de los descendientes en *Neurospora*?

15. ¿Debemos tener en cuenta la recombinación para este problema? ¿Se puede calcular un valor de RF? ¿Qué significa?

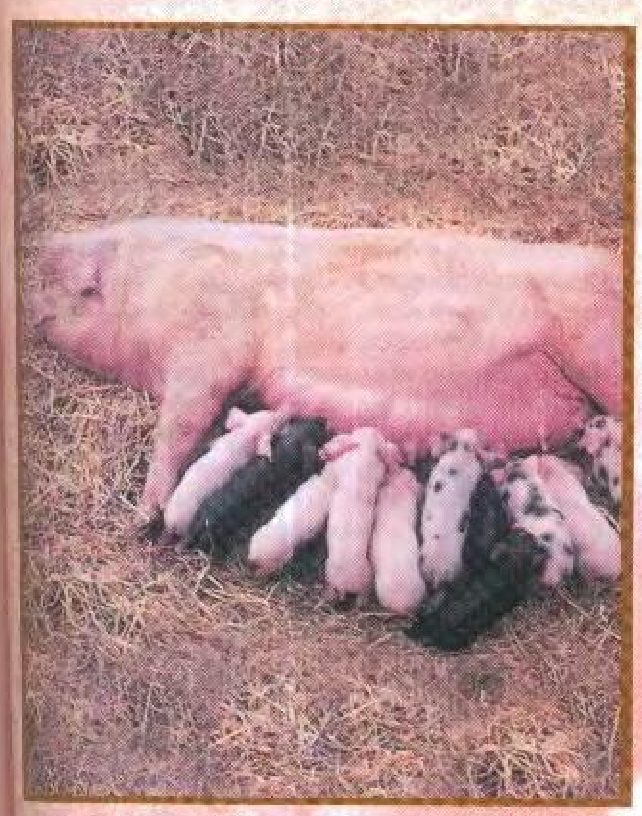
16. ¿Por qué hay sólo dos tipos de colonias con fenotipo colonial? ¿Es posible predecir qué tipo será más frecuente?

17. ¿Qué es una sonda? ¿Qué utilidad tienen las sondas en la Genética molecular? ¿Cómo se utilizan las sondas en el experimento?

18. ¿Cómo podríamos obtener una sonda que reconociese específicamente el plásmido bacteriano?

14

GENÓMICA



Cerdos utilizados en el proyecto internacional de cartografía genómica del cerdo (PiGMaP).
Las dos líneas puras parentales, Large White y Meisham, difieren en muchos marcadores moleculares y morfológicos. Se cruzan estas líneas y los híbridos de la F_1 se cruzan entre sí para generar la F_2. Con la F_2, se utilizan los patrones de distribución de marcadores para determinar ligamiento y para cartografiar el genoma. En esta fotografía, la hembra que aparece recostada es de la F_1 y los cerditos de distintos colores de su F_2. *(Reproducido con la autorización del Roslin Institute, Edimburgo.)*

Ideas fundamentales

La Genómica se ocupa de la caracterización molecular de genomas completos.

El análisis genómico comienza con la utilización de varias técnicas distintas que permiten asignar genes a cromosomas concretos.

El segundo nivel de análisis es la cartografía cromosómica de baja resolución, basada fundamentalmente en el análisis de la recombinación meiótica. En el caso de la especie humana, también pueden utilizarse células híbridas especiales.

La variación en el DNA repetido ha aportado numerosos marcadores moleculares heterocigóticos para su uso en la cartografía por recombinación de alta resolución.

El máximo nivel de resolución en la cartografía genómica es la cartografía física de fragmentos de DNA clonados.

La ordenación de fragmentos de DNA clonados en series solapadas se ve facilitada por procedimientos moleculares especiales que permiten reconocer los clones.

En última instancia, la secuencia del genoma puede obtenerse mediante la secuenciación de un conjunto representativo de clones solapados.

La Genómica aporta una información básica para el aislamiento de genes específicos de interés. Incluyendo los genes relacionados con enfermedades humanas.

La Genómica funcional pretende la comprensión del amplio arco de funciones del genoma en diferentes etapas del desarrollo y bajo diferentes condiciones ambientales.

El objetivo de la Genómica es comprender la organización molecular y la información contenida en el genoma completo y en los productos génicos cifrados por éste. Esta subdisciplina de la Genética emplea muchas de las técnicas analíticas que el genetista aplica a genes individuales o a regiones cromosómicas pequeñas y las extiende de forma global a todo el genoma. De tal modo, resulta posible el estudio directo de la organización a gran escala de los genes y los cromosomas, y el de la regulación global de los genes. A pesar de los considerables obstáculos técnicos, podemos estar seguros de que, en unos pocos años, tendremos un catálogo completo con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de todos los genes y los productos génicos cifrados en los genomas de muchos organismos complejos, incluida la especie humana. El disponer de dichos catálogos proporcionará la materia prima que puede servir como origen para la comprensión de cualquier proceso, desde los asuntos prácticos de las enfermedades humanas y la Genética relacionada con la agricultura a los fenómenos biológicos básicos tales como los que constituyen el fundamento de la fisiología celular, el desarrollo, el comportamiento, la ecología y la evolución. La disponibilidad de estos catálogos es un suceso científico excitante y digno de la transición del milenio, y promete tener efectos dramáticos en el proceso de la investigación científica en Biología.

Genómica: una visión general

La Genómica se divide en dos áreas básicas: la **Genómica estructural**, cuya finalidad es la caracterización de la naturaleza física de genomas enteros; y la **Genómica funcional**, que se encarga de caracterizar el **transcriptoma** (conjunto completo de los transcritos producidos por un organismo concreto) y el **proteoma** (colección completa de las proteínas cifradas en el genoma).

El principal objetivo del análisis genómico estructural es la determinación completa y precisa de la secuencia de DNA de un genoma haploide representativo de una determinada especie. El conocimiento de esta secuencia abre la puerta a numerosas posibilidades. A través del análisis computarizado de la secuencia, empleando los principios desarrollados por la Genética y la Biología molecular para el análisis de transcritos y proteínas, podemos predecir todas las proteínas cifradas. Por otro lado, podemos analizar otros genomas haploides de la misma especie y desarrollar una descripción estadística de la variación genética existente entre las poblaciones de dicha especie; y podemos comparar las secuencias genómicas de especies distintas para, de esta manera, comprender cómo se han reestructurado los genomas en el curso de la evolución. Los estudios de **Genómica comparada** han avanzado ya lo suficiente como para revelar que, en especies relacionadas (por ejemplo, entre los mamíferos), se mantiene una considerable **sintenia** (localización conservada de genes dentro de grandes bloques del genoma). Los estudios de Genómica comparada ofrecen también una herramienta poderosa para la identificación de motivos muy conservados, y por lo tanto funcionalmente importantes, dentro de las secuencias genómicas codificantes y no codificantes. Esto ayuda a los investigadores a confirmar las predicciones sobre las regiones del genoma que cifran proteínas y a identificar elementos reguladores importantes en el DNA.

Aunque la Genómica estructural tuvo su inicio hace tan sólo una década y ya se han obtenido las secuencias de muchos genomas, el recorrido desde los mapas genéticos clásicos hasta llegar a completar los mapas de secuencias de DNA no se hizo en un único paso. Más bien, de manera similar a como se va incrementando progresivamente el aumento en un microscopio óptico, hubo un avance paso a paso en la resolución de los mapas genómicos durante el desarrollo de las tecnologías de la Genómica. En este capítulo, centraremos nuestra atención en el desarrollo de la Genética de alta resolución y de las tecnologías de cartografía física que permitieron, en última instancia, la secuenciación de genomas complejos. Estas tecnologías no representaron tan sólo pasos valiosos en la forma de realizar mapas hasta el nivel de la secuencia, sino que también suministraron herramientas que por sí mismas eran de gran importancia para la identificación de enfermedades genéticas y para la clonación posicional.

Pronto, se evidenció que la disponibilidad de genomas completamente secuenciados estimulaba el apetito científico hacia la obtención de información global adicional. En particular, la transformación de la «piedra Roseta» de la secuencia genómica en predicciones rigurosas de las secuencias de los transcritos y las proteínas resultó ser un desafío en sí mismo, y ello condujo a que evolucionaran los proyectos para la caracterización directa de las estructuras y las secuencias de todos los RNA y los polipéptidos. Estos proyectos han supuesto la base de la creación de la **Genómica funcional**, en la que las estructuras de los transcritos se han caracterizado mediante la secuenciación de los cDNA completos (véanse los Caps. 12 y 13) y la comparación de las secuencias obtenidas con las de los correspondientes DNA genómicos. Como veremos hacia el final de este capítulo, la disponibilidad de estas secuencias de DNA ha permitido el desarrollo de micromatrices extraordinariamente densas en las que cada posición de la matriz representa un RNA diferente. Estas micromatrices (o *chips*), que constituyen un *transcriptoma* completo, pueden colocarse en un solo portaobjetos y exponerse a sondas para la caracterización de las concentraciones de los transcritos en un tipo celular concreto y bajo unas determinadas condiciones ambientales. Estos experimentos de hibridación permiten el análisis de, literalmente, cientos de miles de datos en una sola tarde y proporcionan una información global sobre cómo una determinada condición influye en las actividades de los genes.

Asimismo, de la misma manera que las estrategias empleadas para el transcriptoma, están en desarrollo vías para la identificación sistemática y global del *proteoma* (esto es, todas las proteínas que puede producir una especie). Puesto que, como veremos más adelante en el libro (Cap. 23), muchos procesos biológicos que implican la toma de decisiones requieren modificaciones de las proteínas y cambios en las interacciones proteína-proteína, comprender el proteoma (y el transcriptoma) es tan importante como entender el genoma.

Proyectos genoma: consideraciones prácticas

Hay en marcha proyectos genoma en varios organismos distintos, incluyendo la especie humana y varios organismos modelo

Los sistemas modelos son los mismos que se han explotado profundamente en el análisis genético tradicional. Éstos incluyen a *Mus musculus* (el ratón), *Drosophila melanogaster* (la mosca de la fruta), *Saccharomyces cerevisiae* (la levadura del pan), *Caenorhabditis elegans* (un nematodo), *Arabidopsis thaliana* (una planta) y varias bacterias. Los primeros genomas en secuenciarse por completo fueron los más pequeños. Primero se completaron las secuencias de los genomas víricos, a las que siguieron las de los genomas de los cloroplastos y las mitocondrias. A continuación, se secuenció el primero de una serie de genomas bacterianos. En estos casos, algunos de los genomas se escogieron por su interés genético, otros para el análisis de la diversidad evolutiva entre los procariotas y otros porque los organismos son patógenos importantes de los humanos. En 1996, se publicó la primera secuencia completa de un genoma eucariótico, el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Debido a la magnitud de estas tareas, muchos de los proyectos se llevan a cabo a través de acuerdos internacionales, en los que participan cientos de investigadores que colaboran y comparten datos sobre distintas regiones del genoma. A menudo, los grupos o naciones enteras, incluso, se especializan en el análisis de ciertos cromosomas concretos. Puesto que estos esfuerzos requieren una experimentación a una escala superior a la que puede llevar a cabo un único laboratorio, los proyectos genoma han tenido éxito gracias a la unión de diversos profesionales (genetistas, biólogos moleculares, químicos, físicos, ingenieros e informáticos) para el desarrollo de la tecnología necesaria, incluyendo la automatización de los numerosos pasos del proceso. Este esfuerzo interdisciplinario del análisis genómico es una continuación de la historia científica de la Genética, que se ha beneficiado en muchos aspectos de la interacción intelectual con otras disciplinas (el propio Mendel se formó como físico).

COROLARIO

La caracterización de los genomas completos es importante para entender los principios del diseño de los seres vivos y para el descubrimiento de nuevos genes, tales como los responsables de las enfermedades genéticas humanas.

Antes de la disponibilidad del análisis genómico, los fundamentos genéticos de nuestro conocimiento acerca de un organismo se debían a los mapas cromosómicos, de resolución relativamente baja, de los genes que producían fenotipos mutantes conocidos y de algunos marcadores moleculares. A partir de este punto, el análisis genómico se realiza, por regla general, siguiendo varios pasos de resolución creciente:

1. Situar genes y marcadores moleculares en mapas genéticos de alta resolución de cada cromosoma.
2. Caracterizar y localizar físicamente, unos respecto a otros, fragmentos de DNA clonado, con objeto de crear mapas físicos de cada cromosoma. El mapa genético del genoma puede compararse entonces con el mapa físico.
3. Llevar a cabo análisis a gran escala de la secuencia del genoma para producir un mapa con la secuencia completa de cada cromosoma. Los mapas físicos y genéticos pueden entonces compararse con el mapa de secuencia.

Este análisis de resolución progresivamente creciente va acompañado del incremento en la resolución de los análisis necesarios para encontrar un gen específico. Estas estrategias generales se ilustran en la Figura 14-1.

Genómica estructural

Como sugiere su nombre, el objetivo de la Genómica estructural es caracterizar la estructura del genoma. Conocer la estructura de un genoma individual puede ser útil para la manipulación de genes y segmentos de DNA de una especie en particular. Por ejemplo, los genes se pueden clonar en base al conocimiento de su posición en el genoma. Cuando se han caracterizado varios genomas al nivel de su estructura, es de esperar que, mediante la Genómica comparada, resultará posible deducir las reglas generales que gobiernan la organización estructural de todos los genomas.

La Genómica estructural progresa mediante niveles crecientes de resolución analítica, comenzando con la asignación de genes y marcadores a cromosomas individuales, siguiendo con la cartografía de estos genes y marcadores dentro de los cromosomas y finalizando con la preparación de un mapa físico que culmine con la secuenciación.

Asignación de loci a cromosomas específicos

Existen varios métodos diferentes que permiten asignar genes o marcadores a cromosomas individuales. Algunos de ellos se han tratado en otras partes del libro y se incluyen aquí para ofrecer una visión completa del tema.

Ligamiento a loci conocidos. En los organismos bien estudiados, resulta sencillo cruzar una estirpe que lleva el alelo «nuevo», de posición desconocida, con un una serie de estirpes que tienen marcadores dispersos a lo largo del genoma, cada uno en una posición cromosómica conocida. Las frecuencias de recombinación meiótica menores del 50 % indican que el alelo no cartografiado y un marcador concreto están ligados y, por lo tanto, se encuentran en el mismo cromosoma. A menudo, estos datos de ligamiento dan una idea aproximada de la posición cromosómica, quizás el brazo cromosómico o la banda, incluso, en la que está.

Electroforesis de campo pulsante. Si los cromosomas son lo suficientemente pequeños como para que se puedan separar mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE; del inglés, *Pulse Field Gel Electrophoresis*, véase la Fig. 14-2), las bandas de DNA se pueden utilizar para localizar los nuevos genes mediante hibridación. En primer lugar, se debe establecer qué banda de DNA corresponde a cada cromosoma. El tamaño de los cromosomas, las translocaciones entre cromosomas y la hibridación con sondas cuyas posiciones en los cromosomas se conocen son útiles para este propósito. A continuación, un nuevo gen clonado puede utilizarse como sonda en un Southern del gel de PFGE; y, de esta forma, se puede determinar cuál es el locus cromosómico del gen.

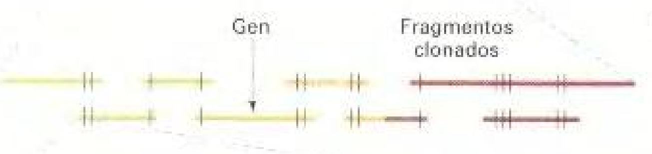
Híbridos de células somáticas hombre-ratón. La técnica de hibridación de células somáticas ha sido ampliamente utilizada en la cartografía genética humana, aunque se puede emplear, en principio, en muchos sistemas animales distintos. La metodología se explicó en el Capítulo 6.

(a)

ASIGNACIÓN DE GENES A UN CROMOSOMA
Ligamento
Hibridación *in situ*
Híbridos celulares
PFGE
Puntos de ruptura de alteraciones cromosómicas



CARTOGRAFÍA CROMOSÓMICA
Recombinación
Híbridos irradiados



CARTOGRAFÍA DE RESTRICCIÓN
Dianas de restricción infrecuentes (▲ ◆)
PFGE

Gen
Fragmentos clonados

CARTOGRAFÍA FÍSICA
YAC
Cósmidos
Alineamiento de marcadores (I)

TTAGCTTAACGTACTGGTACCGTAGTACCGTGGCTTAT

Secuenciación de DNA

(b)

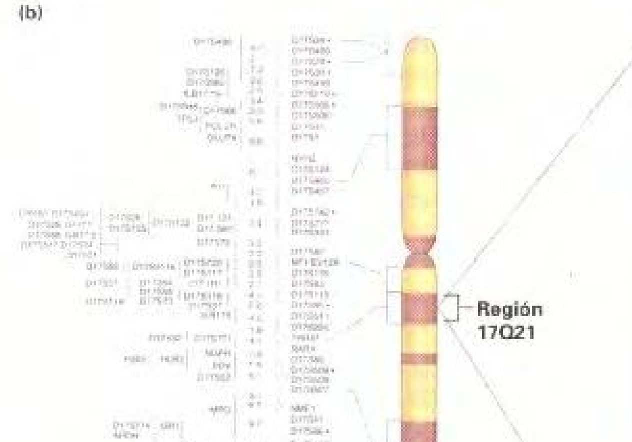
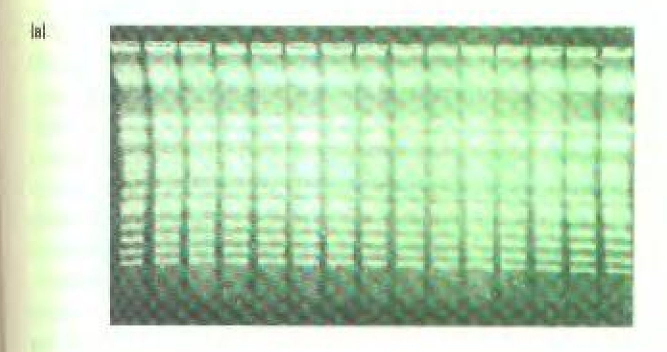


Figura 14-1. Resumen de las estrategias generales de la Genómica estructural. (a) Esquema general de la elaboración de un mapa genómico mediante métodos analíticos de resolución creciente. (b) Búsqueda de un gen concreto, el gen del cáncer de mama BRCA1, empleando mapas genómicos cada vez más detallados (Parte b copyright, © 1994 de New York Times Company. Reproducción autorizada.)

Mapas cromosómicos de alta resolución

El siguiente nivel de resolución consiste en determinar la posición de un gen o marcador molecular en el cromosoma. Este paso es importante, ya que los mapas genéticos que se generan se alinearán con los mapas físicos que veremos en el siguiente apartado y se utilizarán para verificar dichos mapas físicos. Además, los clones producidos como parte del mapa físico puede



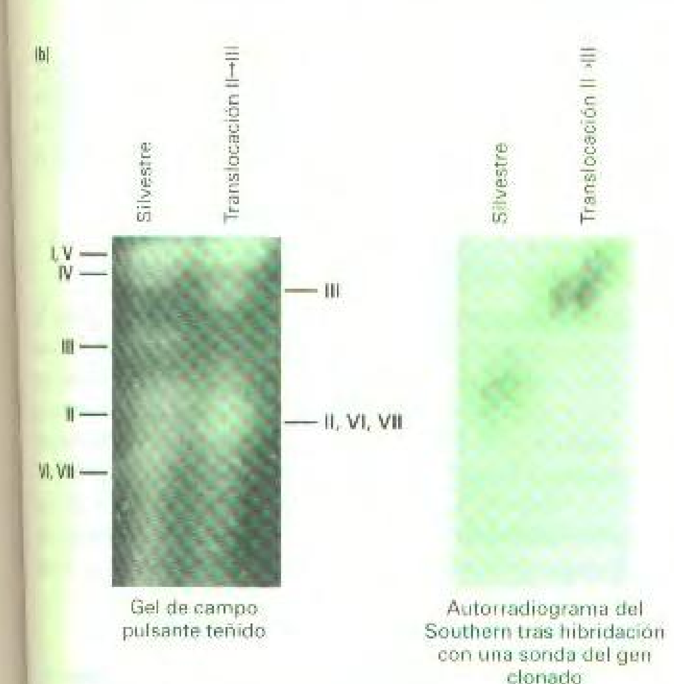


Figura 14-2. (a) Electroforesis en campo pulsante de DNA cromosómico digerido de diferentes estirpes de levadura. Se distinguen 16 bandas. Al haber 22 cromosomas en levadura, algunos de ellos han debido migrar juntos en el gel. (Todas las calles se cargaron de forma idéntica). (b) La electroforesis en campo pulsante separa los cromosomas de *Neurospora* y facilita la localización de un gen clonado en un segmento cromosómico: (*a la izquierda*) se observan los siete cromosomas silvestres y una translocación en la que una porción de 100 kb del cromosoma II se ha insertado en el cromosoma III; (*a la derecha*) autorradiograma realizado después de hibridar con una sonda de un gen clonado de localización desconocida. Los resultados demuestran que el gen está situado en la región translocada del cromosoma II. (Parte a tomada de Bio-Rad Laboratories; parte b tomada de Myron Smith.)

ayudar a identificar el DNA genómico correspondiente a los genes del mapa genético. Se utilizan varios métodos diferentes para localizar genes y marcadores.

Cartografía por recombinación meiótica. La cartografía por ligamiento meiótico que se utiliza en Genómica se basa en los principios de cartografía tratados en el Capítulo 5. En otras palabras, en el análisis de las frecuencias de recombinación en cruzamientos dihíbridos y multihíbridos. En organismos experimentales como la levadura, *Neurospora*, *Drosophila* y *Arabidopsis*, los genes que determinan diferencias en características fenotípicas cualitativas se pueden cartografiar de forma directa, gracias a la facilidad con que se pueden realizar cruzamientos controlados (como los cruzamientos de prueba). Por lo tanto, se dispone en estos organismos de mapas cromosómicos elaborados a lo largo de los años, que están llenos de genes de efecto fenotípico conocido, todos ellos asignados a sus respectivos loci.

Por varias razones, éste no es el caso en la especie humana. En primer lugar, hay una carencia de cruzamientos informativos. En segundo lugar, los tamaños de las muestras de los descendientes son demasiado pequeños como para hacer análisis estadísticos fiables que permitan determinar la existencia de ligamiento. En tercer lugar, el genoma humano es enorme. De hecho, incluso la asignación de un gen responsable de una enfermedad humana a un autosoma concreto por análisis de ligamiento constituyó una tarea difícil (la mayoría de los genes con fenotipos conocidos se asignaron mediante cartografía de híbridos de células somáticas hombre-ratón y no por análisis de la RF).

Incluso en los organismos cuyos mapas aparecen «llenos» de loci de efectos fenotípicos conocidos, se demostró que los intervalos cromosómicos entre genes conocidos debían contener cantidades enormes de DNA. Estos intervalos, o «huecos», no se podían cartografiar por análisis de ligamiento, puesto que no había marcadores en dichas regiones. Para la obtención de mapas de mayor resolución, era preciso conseguir un gran número de marcadores genéticos adicionales que se pudieran utilizar para rellenar los huecos. Esto se resolvió con el descubrimiento de varias clases de **marcadores moleculares**. Un marcador molecular es un sitio en el que hay heterocigosis para algún tipo de **variación neutra del DNA**. La variación neutra es aquella que no está asociada a ninguna variación fenotípica observable. Cuando está en heterocigosis, este «locus de DNA» se puede utilizar en cartografía genética como cualquier par de alelos convencionales en heterocigosis. Dado que los marcadores moleculares pueden detectarse fácilmente y son tan numerosos en los genomas, una vez cartografiados mediante análisis de ligamiento, rellenan los huecos entre genes de fenotipo conocido. Observe que, en la cartografía, el significado biológico del marcador no es importante en sí mismo; el sitio heterocigótico es simplemente un punto de referencia convencional cuya utilidad es la de permitir «orientarse» en el genoma. En este sentido, los marcadores se utilizan como los mojones utilizados por los viajeros en los siglos anteriores. Viajeros que no estaban interesados en los propios mojones (marcadores) y, sin embargo, se habrían desorientado sin ellos.

Polimorfimos en la longitud de los fragmentos de restricción. Los RFLP (descritos en los Capítulos 1, 5 y 13) fueron los primeros marcadores neutros de DNA que se aplicaron en la cartografía genómica por frecuencia de recombinación.

Marcadores de DNA basados en la variabilidad en el número de repeticiones de secuencias cortas. Aunque los RFLP fueron los primeros marcadores de DNA en utilizarse de forma generalizada en la caracterización genómica, tanto en los análisis de los genomas en los animales como en las plantas, hoy día han sido reemplazados por marcadores que se basan en la variación en el número de repeticiones en tándem de secuencias cortas. Estos marcadores reciben colectivamente la denominación de **poli-**

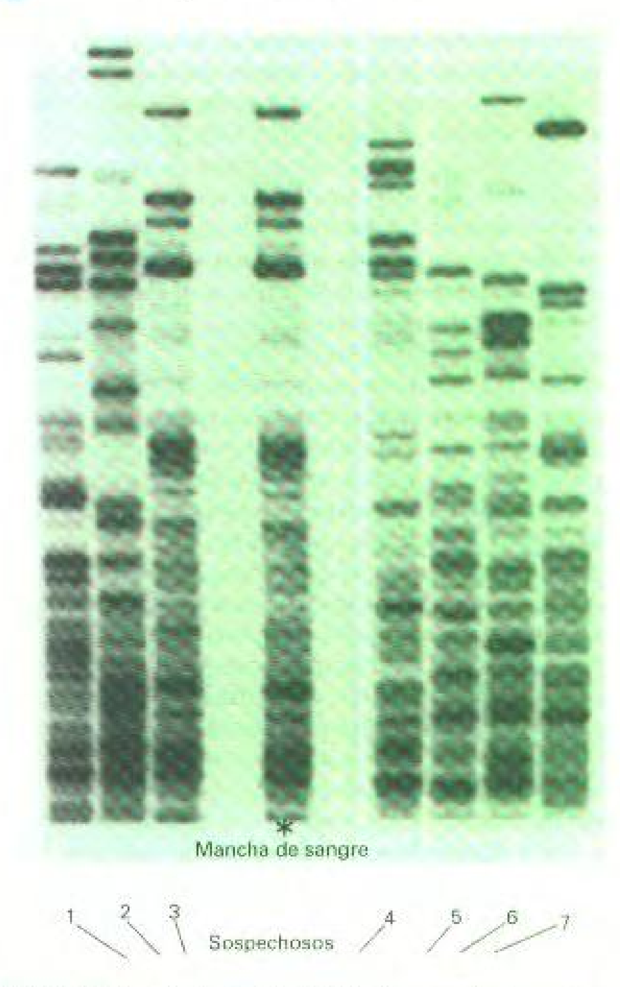


Figura 14-3. Huellas digitales de DNA de una mancha de sangre encontrada en la escena de un crimen y de la sangre de siete sospechosos. (Cellmark Diagnostics, Germantown, MD.)

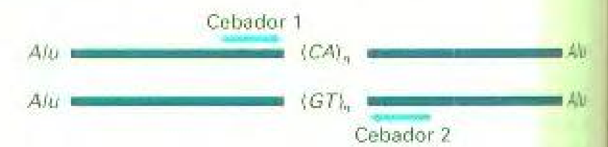
morfimos en la longitud de secuencias sencillas (SSLP; del inglés, *Simple-Sequence Length Polymorphism*). Los SSLP ofrecen dos ventajas básicas sobre los RFLP. Primero, respecto a los RFLP, usualmente aparecen sólo uno o dos «alelos», o morfos, en un pedigrí o una población en estudio. Esto limita su utilidad; sería mejor contar con un gran número de alelos que servirían como marcas específicas de una gran variedad de regiones cromosómicas homólogas. Los SSLP cubren esta necesidad, dado que el alelismo múltiple es mucho más común, habiéndose encontrado hasta 15 alelos de un locus. Segundo, el grado de heterocigosis de los RFLP puede ser bajo; en otras palabras, si un alelo de un locus es relativamente raro en relación con el otro, la proporción de heterocigotos (los individuos cruciales en la cartografía) será baja. Los SSLP, sin embargo, además de ofrecer más alelos, muestran niveles de heterocigosis mucho mayores, lo que los hace más útiles en cartografía genética que los RFLP, puesto que los heterocigotos son la base del análisis por recombinación. En la actualidad, se utilizan rutinariamente dos tipos de SSLP en Genómica.

1. *Marcadores minisatélites.* Estos marcadores se basan en la variación en el número de repeticiones en tándem de los minisatélites (VNTR; del inglés, *Variable Number of Tandem Repeats*). Una huella digital de DNA es un conjunto de bandas que resulta de la hibridación Southern de una digestión con enzimas de restricción (Figs. 14-3 y 14-4). Las bandas individuales de la huella digital del DNA representan secuencias de diferentes tamaños de muchas posiciones cromosómicas distintas. Si los parentales difieren en una banda concreta, esta diferencia se convierte en un locus heterocigótico («más/menos») que se puede utilizar en cartografía. La Figura 14-5 muestra un ejemplo sencillo. Esta misma técnica es aplicable a la mayoría de los organismos con DNA repetido.

2. *Marcadores microsatélites.* Recuerde que el DNA microsatélite es una clase de DNA repetido que se basa en repeticiones de dinucleótidos. El tipo más común es la repetición del dinucleótido CA y su complementario GT, como en el ejemplo siguiente:

   5′ ...... C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A ... 3′
   3′ ...... G-T-G-T-G-T-G-T-G-T-G-T-G-T-G-T ... 5′

   Las sondas para detectar estos segmentos se generan con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; véase el Cap. 12). La digestión de DNA humano con el enzima de restricción *Alu*I da lugar a fragmentos con un tamaño medio de 400 pares de bases, que se clonan en un vector fágico M13. Los fagos con insertos $(CA)_n/(GT)_n$ se identifican mediante hibridación con una sonda $(CA)_n/(GT)_n$. Se secuencian los clones positivos y se diseñan las parejas de cebadores en base a las secuencias que flanquean el tramo repetido.



   Los cebadores se emplean para la reacción de amplificación, utilizando DNA genómico como sustrato. Una pareja de cebadores concreta amplificará su propio tramo repetido y cualquier variante en el tamaño del mismo que aparezca en el DNA de distintos individuos. Una elevada proporción de las parejas de cebadores revela la presencia de al menos tres «alelos» marcadores, que se distinguen por las diferencias en los tamaños de los productos de amplificación. La Figura 14-6 muestra un ejemplo de la técnica de cartografía con microsatélites. Pueden fabricarse miles de parejas de cebadores que, igualmente, detectan miles de loci marcadores. La Figura 14-7 muestra el último mapa de marcadores microsatélites del cromosoma 1 humano.

Advierta algunas diferencias en cuanto a las ventajas de los análisis de RFLP y de SSLP. El análisis de RFLP requiere tener a mano en el laboratorio una sonda concreta clonada para la detección de cada locus marcador individual. El análisis de microsatélites requiere una pareja de cebadores para cada locus marcador, pero estas secuencias cebadoras pueden ser fácilmente compartidas por todo el mundo, distribuidas por correo electró-

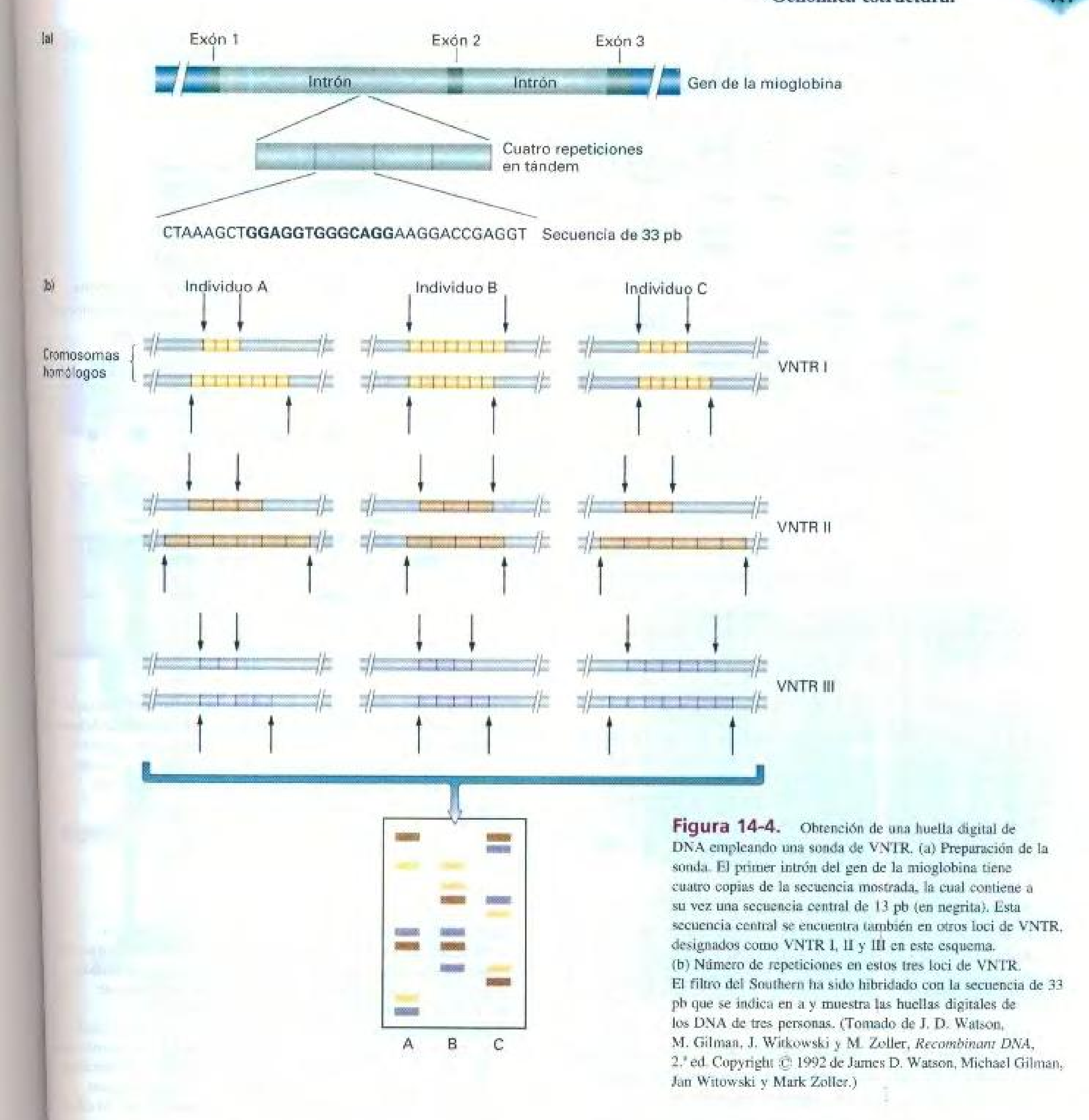
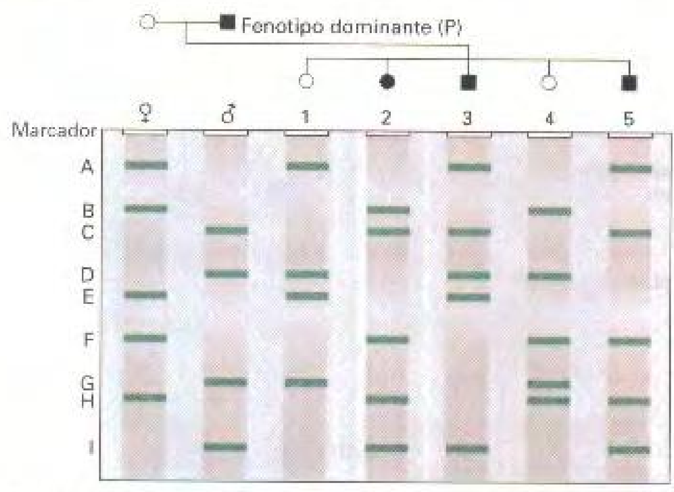


Figura 14-4. Obtención de una huella digital de DNA empleando una sonda de VNTR. (a) Preparación de la sonda. El primer intrón del gen de la mioglobina tiene cuatro copias de la secuencia mostrada, la cual contiene a su vez una secuencia central de 13 pb (en negrita). Esta secuencia central se encuentra también en otros loci de VNTR, designados como VNTR I, II y III en este esquema. (b) Número de repeticiones en estos tres loci de VNTR. El filtro del Southern ha sido hibridado con la secuencia de 33 pb que se indica en a y muestra las huellas digitales de los DNA de tres personas. (Tomado de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witowski y Mark Zoller.)

...co y fabricadas rápidamente con un sintetizador de DNA. El ...lisis de minisatélites requiere sólo una sonda que detecte la ...cuencia central del elemento repetido en cualquiera de los loci ...tribuidos por todo el genoma.

El descubrimiento de los marcadores de RFLP y de SSLP ha ...mitido la construcción de un mapa genético humano con una ...solución de un centimorgan [cM o unidad de mapa (u.m.)]. ...nque esta resolución constituye un logro notable, un centi...organ es todavía un tramo enorme de DNA, que en la especie ...umana se estima que equivale a 1 megabase (1 Mb = 1 millón de pares de bases, o 1000 kb). En la actualidad, se están elaborando mapas genéticos con una resolución mayor, que se basan en los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP; del inglés, *Single-Nucleotide Polymorphism*). Un SNP es un sitio del genoma formado por un único par de bases para el que, en las poblaciones naturales, aparece normalmente más de uno de los cuatro posibles pares de bases. Se han identificado y cartografiado en el genoma más de varios cientos de miles de sitios SNP, lo que proporciona el mapa con mayor densidad de marcadores.



EJEMPLOS DE ANÁLISIS
F y H Siempre se heredan juntos – ¿ligados?
A y B En los descendientes, siempre aparece A ó B – ¿alélicos?
A y D Cuatro combinaciones: A y D, A, D o ninguno – ¿no ligados?
F, H y E Siempre aparecen F y H o E – ¿estrechamente ligados en *trans*?
Alelo *P* Posiblemente ligado a I y C

Figura 14-5. Utilización de las bandas de la huella digital de DNA como marcadores moleculares en cartografía. Se muestran las huellas digitales simplificadas de los parentales y cinco descendientes. Los ejemplos ilustran métodos de análisis de ligamiento. Los marcadores moleculares pueden cartografiarse unos respecto a otros o respecto a un locus de expresión fenotípica conocida.

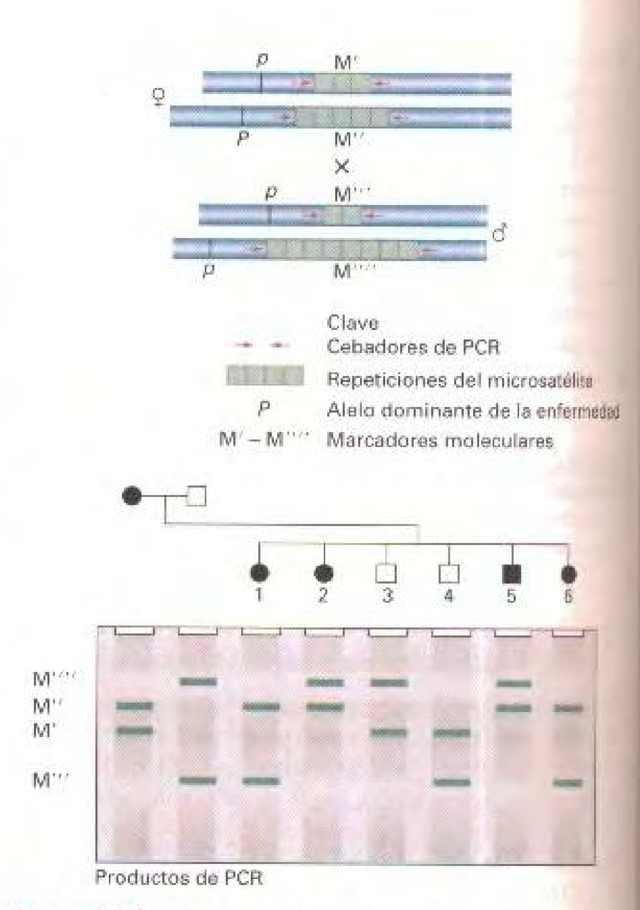


Figura 14-6. Utilización de las repeticiones de microsatélites como marcadores moleculares en la cartografía. Se muestran los patrones de bandas de PCR de una familia con seis hijos, y se interpretan en la parte superior de la figura mediante cuatro «alelos» de distinto tamaño de un microsatélite (M' a M''''), uno de los cuales (M'') está probablemente ligado en *cis* al alelo *P* responsable de la enfermedad.

COROLARIO

El análisis por recombinación meiótica de los loci de genes de efecto fenotípico conocido y de marcadores de RFLP y de SSLP ha dado lugar a un mapa del genoma humano con un nivel de resolución de 1 centrimorgan (1 unidad de mapa). El análisis de los SNP promete incluso una resolución mayor.

DNA polimórficos amplificados al azar (RAPD). Un único cebador para PCR diseñado al azar amplificará, a menudo, por casualidad varias regiones distintas del genoma. La secuencia única «encuentra» DNA flanqueado por dos copias invertidas de la secuencia del cebador. El resultado es un conjunto de bandas amplificadas de DNA con diferentes tamaños (Fig. 14-8). En un cruzamiento, algunas de las bandas amplificadas pueden ser únicas de un parental, en cuyo caso pueden tratarse como loci heterocigóticos (+/–) y utilizarse como marcadores moleculares en el análisis cartográfico. Observe también que el conjunto de fragmentos de DNA amplificados, llamados **DNA polimórficos amplificados al azar (RAPD**; del inglés, *Randomly Amplified Poymorphic DNA*, pronunciado como «rapid»), ofrece otro tipo de huella digital de DNA que puede utilizarse para caracterizar un organismo individual. Tales marcas de identidad pueden ser muy útiles para el análisis genético rutinario o en los estudios de las poblaciones.

Hibridación *in situ*. Un gen clonado puede utilizarse para fabricar una sonda marcada con la que poder hibridar cromosomas *in situ*. Si se puede reconocer cada cromosoma de una dotación genómica por su patrón de bandas, tamaño, relación de tamaños

Figura 14-7. Mapa de ligamiento del cromosoma 1 humano, correlacionado con su patrón de bandas. El histograma muestra la distribución de todos los marcadores disponibles del comosoma 1. Algunos marcadores son genes de fenotipo conocido, pero la mayoría son marcadores de DNA basados en variaciones neutras de las secuencias.

En la parte central de la figura, aparece un mapa de ligamiento basado en los análisis de las frecuencias de recombinación que se han descrito en este capítulo y en el Capítulo 5. El mapa muestra sólo alguno de los marcadores disponibles. Las distancias de mapa vienen indicadas en centimorgans (cM o u.m.). La longitud total del mapa del cromosoma 1 es de 356 cM; se trata del más largo de los cromosomas humanos.

Las posiciones de algunos marcadores se han relacionado con el diagrama de las subregiones del cromosoma 1 basadas en el patrón estándar de bandas (dicho diagrama recibe la denominación de idiograma). Este tipo de correspondencia se puede establecer sólo mediante hibridación *in situ* o análisis citogenético (Cap. 17). La mayoría de los marcadores mostrados en el mapa son moleculares, pero se incluyen también varios genes (destacados en verde claro):

APOA2	apolipoproteína
ACTN2	proteína actina
CRP	proteína reactiva C
SPTA1	proteína espectrina

(Tomado de B. R. Jasney et al., «The Genome Maps 1994», *Science*, 265, 1994, 2055-2070.)

Distribución de loci | Distancia (cM) | Mapa de ligamiento | Idiograma

356.0 cM

Clave

Polimorfismos en la longitud de secuencias cortas

Otros polimorfismos de DNA

(Marcadores de DNA)

Genes

Genes incluidos en el mapa de ligamiento

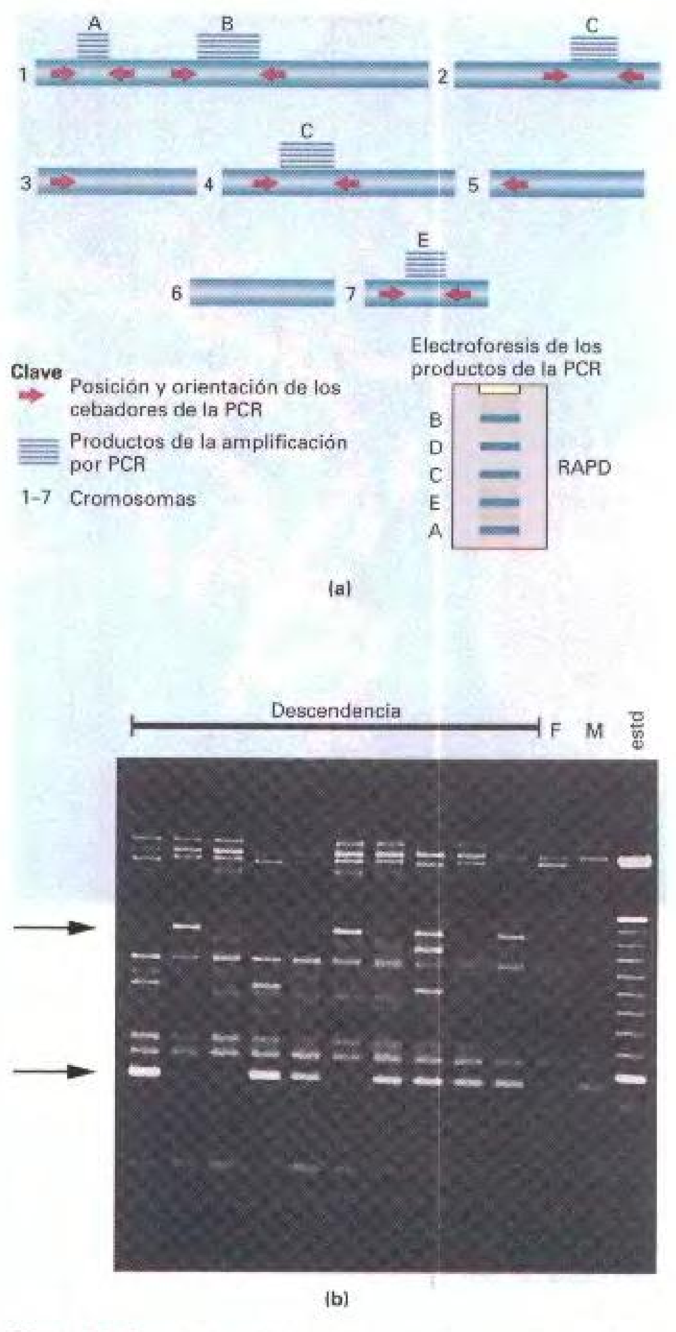


Figura 14-8. (a) El análisis de DNA amplificado al azar (análisis de RAPD) proporciona marcadores moleculares cromosómicos. Si otra estirpe carece de una de las bandas, se puede considerar que tal banda pertenece a un locus marcador heterocigótico para su uso en la cartografía, como se muestra en el ejemplo de la parte b. (b) Análisis de RAPD en un cruzamiento de una especie de árbol. Se utilizó un cebador de 10 nucleótidos para amplificar regiones de DNA genómico en los árboles parentales (M = masculino, F = femenino) y de 10 descendientes. En la columna de la derecha, marcada «estd», aparecen muestras de DNA estándar para calibrar los tamaños. Las flechas apuntan a dos bandas que representan dos loci de un cruzamiento de prueba «dihíbrido». Los dos alelos de ambos loci se manifiestan como presencia o ausencia de una banda de RAPD. De los dos parentales, únicamente el masculino mostró estas bandas, pero debía ser heterocigótico para la presencia (alelo +) o ausencia (alelo −) de las bandas de ambos loci. El parental masculino podría designarse $1^+/1^- \cdot 2^+/2^-$, y el femenino $1^-/1^- \cdot 2^-/2^-$. Los descendientes muestran varias combinaciones parentales y no parentales de estos alelos. (John E. Carlson.)

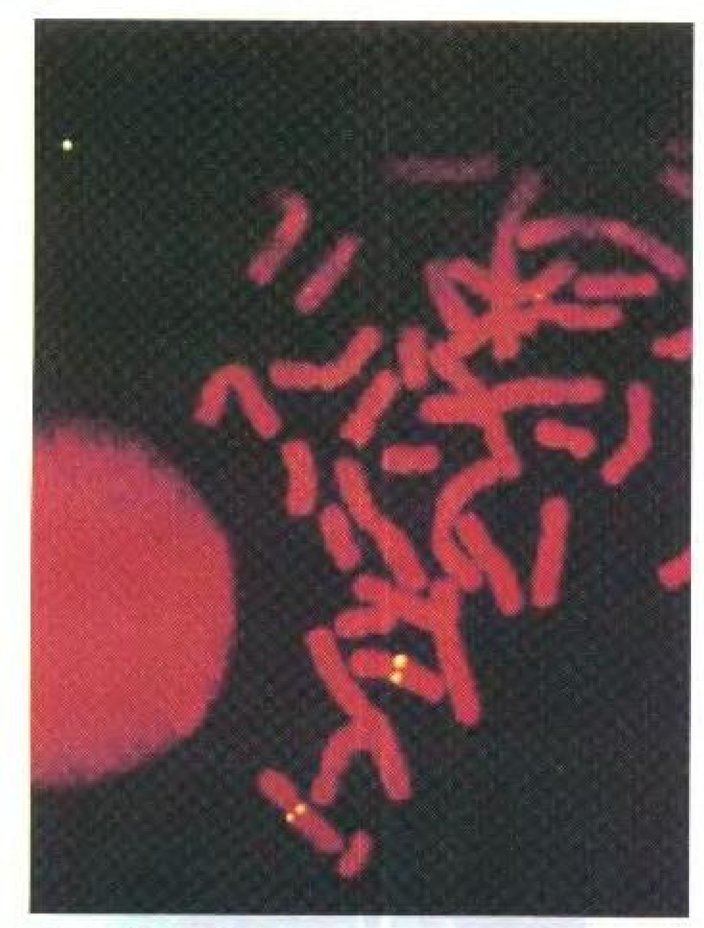


Figura 14-9. Análisis FISH. Los cromosomas se han hibridado *in situ* con una sonda fluorescente específica de un gen presente en una sola copia por dotación cromosómica, en este caso, el gen de una proteína del músculo. Sólo un locus muestra una mancha fluorescente, que corresponde a la sonda unida al gen de la proteína del músculo. (Tomado de P. Lichter et al., «High-Resolution Mapping of Human Chromosome 11 by in Situ Hybridization with Cosmid Clones», *Science* 247, 1990, 64.)

entre los brazos u otra característica citológica, entonces podemos asignar el nuevo gen al cromosoma con el que hibrida. Además, el sitio de hibridación revela la posición cromosómica aproximada del gen.

Las sondas se marcan comúnmente con radiactividad o fluorescencia. En el procedimiento de hibridación *in situ* fluorescente (FISH; del inglés *Fluorescent In Situ Hybridization*), el clon se marca con un compuesto fluorescente, y se baña con él una preparación cromosómica parcialmente desnaturalizada. La sonda se une al cromosoma *in situ*, y la localización del fragmento clonado se reconoce por una mancha brillante de fluorescencia (Fig. 14-9). El coloreado de cromosomas es una extensión de la técnica FISH. En este caso, un conjunto de fragmentos de DNA clonados, que sabemos pertenecen a cromosomas o regiones cromosómicas concretas, se marcan con compuestos fluorescentes diferentes. Estos compuestos «colorean» así regiones específicas y permiten distinguirlas al microscopio (Fig. 14-10). Si un clon de un gen cuya posición se desconoce se marca con otro compuesto fluorescente, se puede establecer su posición en la serie de cromosomas coloreados.

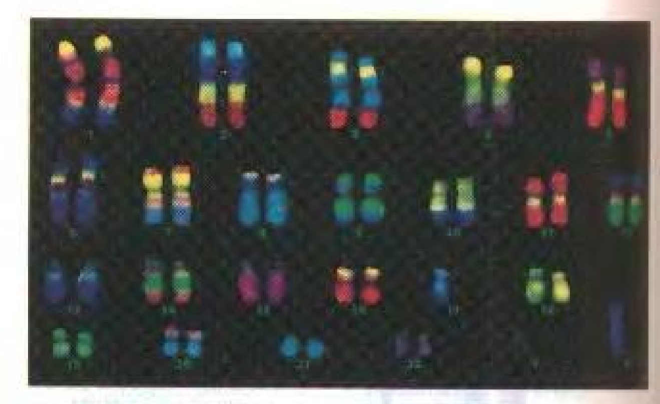


Figura 14-10. Coloreado cromosómico mediante hibridación *in situ* con diferentes sondas marcadas. (Applied Imaging, Hylton Park, Wessington, Sunderland, U. K.)

Puntos de ruptura de reorganizaciones cromosómicas. En el Capítulo 17, veremos que los alelos mutantes que dan un nuevo fenotipo observable se generan a veces mediante una reorganización cromosómica. Normalmente, estas mutaciones son achacables a que las roturas cromosómicas debidas a las reorganizaciones rompen los genes en dos, interrumpiendo secuencias estructurales o reguladoras esenciales. Si el punto de ruptura se puede ver o cartografiar con marcadores conocidos, aplicando el análisis de recombinación, esta información se puede emplear para asignar un gen a una posición en el mapa citogenético de un cromosoma. Una característica útil de los puntos de ruptura de las reorganizaciones es que también sirven como marcadores moleculares. Cuando se ha identificado un clon de DNA que cubre el punto de ruptura, éste se detecta en un experimento de

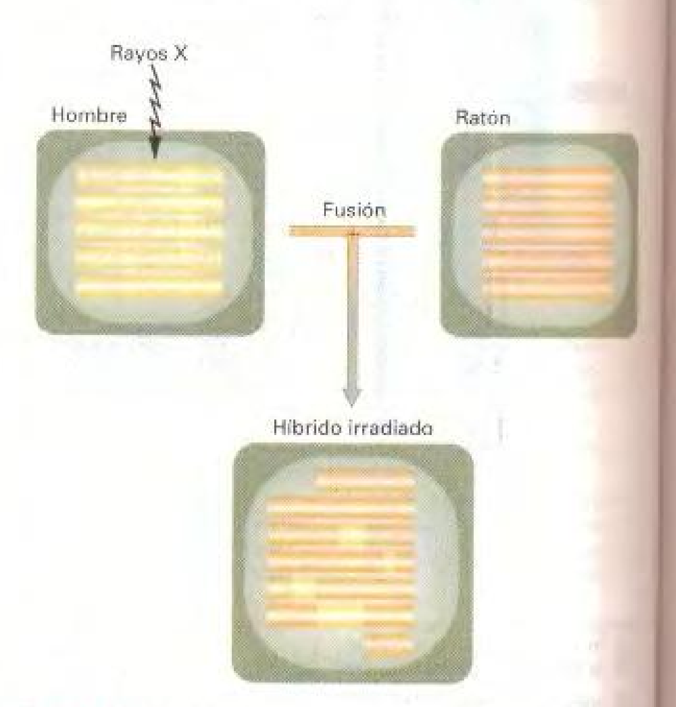


Figura 14-11. Generación de híbridos irradiados con rayos X. Los fragmentos de los cromosomas humanos se integran en los del ratón. El análisis de la presencia simultánea de marcadores humanos en un panel de varios híbridos irradiados puede desvelar la existencia de ligamiento.

Southern como una banda esperada que desaparece para dar lugar a la aparición de dos nuevas bandas.

Cartografía con híbridos irradiados. La técnica que se utiliza para localizar genes en cromosomas individuales se puede extender a la obtención de un mapa genético. Una extensión importante es la **cartografía con híbridos irradiados**. Esta técnica se diseñó para generar un mapa de alta resolución de marcadores moleculares distribuidos por todo el cromosoma. El procedimiento consiste en irradiar células humanas con rayos X para fragmentar los cromosomas y, a continuación, fusionar las células irradiadadas con células de ratón para formar un panel de híbridos distintos. En este caso, los híbridos tienen un conjunto de *fragmentos* de los cromosomas humanos, como se representa en la Figura 14-11. La mayoría de los fragmentos están embebidos en los cromosomas de ratón, pero se pueden encontrar también cromosomas humanos truncados. Primero se calcula la frecuencia de aparición de varios marcadores moleculares humanos en los híbridos. El paso siguiente es calcular la frecuencia con que aparecen simultáneamente parejas de marcadores moleculares humanos. Hay que asumir que los marcadores estrechamente ligados entre sí se incorporarán juntos con mucha frecuencia, ya que la probabilidad de que ocurra una rotura inducida por la radiación entre los dos loci es baja. La aparición simultánea de marcadores alejados entre sí, así como de los que están en cromosomas diferentes, debería suceder con una frecuencia cercana al producto de las frecuencias individuales. Se utiliza una unidad de cartografía, cR_{3000}, que se ha calibrado a un valor aproximado de 0.1 cM (u.m.).

La obtención de un panel estándar con unos 100 a 200 híbridos es bastante sencilla. Este panel sería suficiente para obtener un mapa cR_{3000} de alta resolución del genoma humano, que tendría una resolución diez veces mayor que el mapa genético actual en centimorgans. Una desventaja de la técnica es que está limitada a los marcadores para los que existen diferencias entre el genoma humano y el del ratón.

COROLARIO

La correlación entre marcadores humanos y cromosomas en líneas celulares híbridas hombre-ratón permite asignar los marcadores a cromosomas. La presencia simultánea de marcadores humanos diferentes en los híbridos irradiados con rayos X permite cartografiar con alta resolución las posiciones cromosómicas de los marcadores.

En esta sección sobre la cartografía de marcadores, hemos visto técnicas que se basan en premisas muy distintas, como la frecuencia de entrecruzamientos meióticos y las roturas cromosómicas inducidas por radiación. Por lo tanto, aunque los distintos mapas proporcionan el mismo orden de marcadores, las distancias de los marcadores en un mapa pueden no ser proporcionales a las distancias entre ellos en otro mapa.

Cartografía física de los genomas

Un incremento adicional en el grado de resolución cartográfica se consigue mediante la manipulación directa de fragmentos de DNA clonados. Como el DNA es la materia física del genoma, los procedimientos empleados se denominan, de forma general, **cartografía física**. Un objetivo de la cartografía física es generar un conjunto de clones con fragmentos *solapados*, que cubran entre todos un cromosoma entero o un genoma completo. El mapa físico resultante presenta tres características útiles. En primer lugar, permite ordenar los marcadores genéticos presentes en los clones, contribuyendo así al proceso general de cartografía del genoma. En segundo lugar, una vez obtenidos, los clones contiguos representan una serie ordenada de secuencias de DNA que se puede explotar en futuros análisis genéticos, como la búsqueda de correlaciones entre fenotipos mutantes y alteraciones en determinadas regiones moleculares. En tercer lugar, estos clones constituyen la materia prima para la obtención de la secuencia de nucleótidos en los proyectos genoma a gran escala.

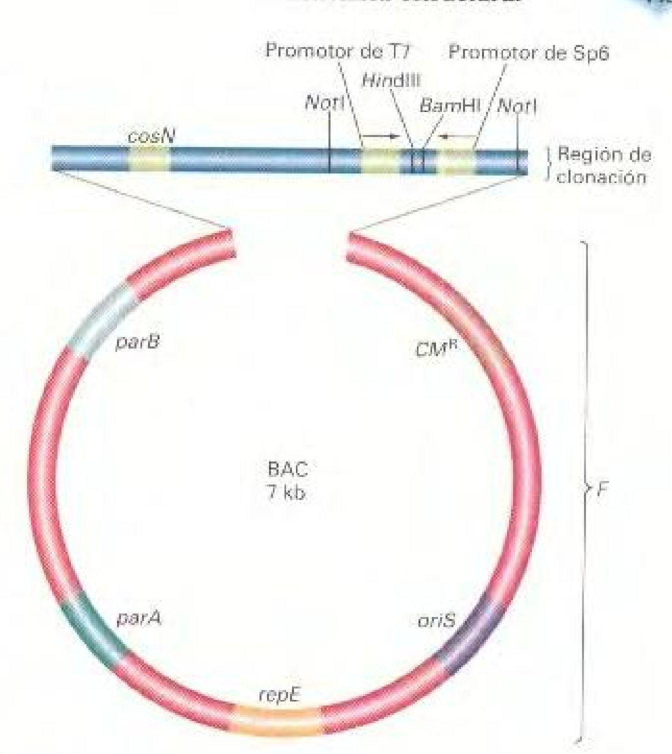


Figura 14-12. Estructura de un cromosoma artificial bacteriano (BAC), empleado para clonar fragmentos largos de DNA foráneo. CM^R es un marcador seleccionable de resistencia a cloranfenicol. *oriS*, *repE*, *parA* y *parB* son genes del plásmido F necesarios para su replicación y la regulación del número de copias. *cosN* es el sitio *cos* del fago λ. *Hin*dIII y *Bam*HI son sitios de clonación en los que se inserta el DNA foráneo. Los promotores de T7 y Sp6 permiten transcribir el fragmento insertado. Los sitios *Not*I se emplean para retirar el fragmento insertado.

En la preparación de los mapas físicos de los genomas, los vectores que pueden incorporar insertos muy grandes son, naturalmente, los más útiles. Los más utilizados son los cósmidos, YAC (cromosomas artificiales de levadura; del inglés, *yeast artificial chromosomes*), BAC (cromosomas artificiales de bacterias; del inglés, *bacterial artificial chromosomes*) y PAC (cromosomas artificiales derivados del fago P1; del inglés, *P1-based artificial chromosomes*). Los cósmidos y YAC se trataron en los Capítulos 12 y 13. Los **BAC** (Fig. 14-12) se basan en el plásmido F de 7 kb de *E. coli*. Recuerde que este plásmido puede llevar grandes fragmentos de DNA de *E. coli* como derivado F'

(Cap. 7). De forma similar, como vector de clonación, puede llevar también fragmentos de DNA foráneo de gran longitud, hasta de 300 kb, aunque el tamaño medio está alrededor de 100 kb. Los **PAC** se construyen mediante una manipulación similar del fago P1, y llevan insertos comparables a los de los BAC.

Aunque los tamaños máximos de los insertos en los BAC y los PAC no es tan grande como el de los YAC, los primeros presentan ciertas ventajas sobre éstos. En primer lugar, se amplifican en las bacterias, y se pueden aislar y manipular simplemente con las técnicas básicas que se emplean con los plásmidos bacterianos. En segundo lugar, los BAC y los PAC generan menos insertos híbridos que los YAC. Insertos híbridos son los que se componen de varios fragmentos distintos, y su presencia puede arruinar los intentos de ordenar los clones.

No obstante, a pesar de estos útiles vectores, la tarea de clonar todo un genoma resulta desalentadora. Incluso los genomas considerados pequeños contienen cantidades inmensas de DNA. Considere, por ejemplo, el genoma de 100 Mb del pequeño nematodo *Caenorhabditis elegans*; como el tamaño medio de los insertos de los cósmidos es de unas 40 kb, se necesitarían al menos 2500 cósmidos para abarcar este genoma, y muchos más para asegurarse que no quede ningún hueco sin cubrir. Los YAC pueden llevar fragmentos del orden de 1 Mb, así que con ellos la tarea resulta algo más sencilla.

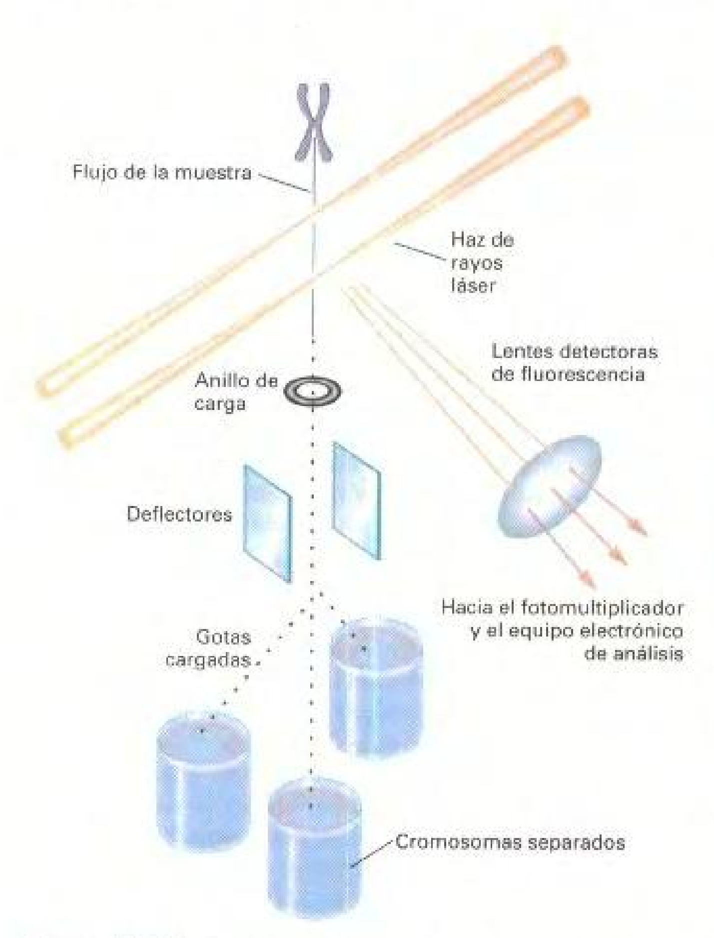


Figura 14-13. Purificación de cromosomas mediante citometría de flujo. Los cromosomas se tiñen con un compuesto fluorescente y se pasan a través de un haz de rayos láser. Se mide la intensidad de la fluorescencia de cada cromosoma que pasa y, de acuerdo con ella, es desviado al tubo colector correspondiente. Los cromosomas se recogen en pequeñas gotas.

La clonación de un genoma completo comienza con la obtención de un gran número de insertos clonados aleatoriamente. El contenido de los clones se debe caracterizar de alguna forma que permita establecer los solapamientos. Un conjunto de clones solapados se denomina ***contig***. En las fases iniciales de los proyectos genoma, los *contigs* son numerosos y representan «islas» clonadas del genoma. Sin embargo, conforme se caracterizan más clones, los *contigs* se hacen más largos y se solapan con otros, hasta que el proyecto acaba generando un *contig* para cada cromosoma.

Genotecas específicas de cromosomas. Si la genoteca de clones se prepara a partir de DNA genómico total, la elaboración de los *contigs* es muy lenta. Sin embargo, si se utiliza un cromosoma concreto para hacer la genoteca, los *contigs* se elaboran más rápidamente. Puede emplearse la PFGE para aislar cromosomas individuales (si son pequeños) o segmentos cromosómicos resultantes del corte con enzimas de restricción que generan fragmentos muy largos, como *Not*I. Otra opción para preparar DNA de un cromosoma concreto es la **citometría de flujo**. Los cromosomas (como los humanos) se pueden separar por citometría de flujo mediante la técnica de separación de cromosomas activada por fluorescencia (FACS; del inglés, *Fluorescence-Activated Chromosome Sorting*; Fig. 14-13). En esta técnica, los cromosomas metafásicos se tiñen con dos colorantes, uno que se une a regiones ricas en AT y otro que lo hace a regiones ricas en GC. Se rompen las células para liberar los cromosomas a una suspensión líquida. Esta suspensión se pulveriza de forma que la concentración de cromosomas es tal que cada gota contiene un solo cromosoma. La suspensión pulverizada se pasa a través de un rayo láser calibrado para excitar la fluorescencia. Cada cromosoma produce su propia señal fluorescente característica, que es reconocida electrónicamente para que dos placas deflectoras dirijan las gotas que contienen el cromosoma deseado a un tubo colector.

COROLARIO

La clonación genómica comienza con el ensamblaje de clones en grupos solapados denominados *contigs*. Conforme se van acumulando más datos, los *contigs* terminan por equivaler a cromosomas completos.

Se utilizan varias técnicas distintas para ordenar los clones genómicos en *contigs*. A continuación, trataremos algunas de las más importantes.

Ordenamiento mediante FISH. Si se dispone de buenas marcas cromosómicas, se puede utilizar el análisis FISH para localizar las posiciones aproximadas de los insertos grandes. La Figura 14-14 muestra los resultados de un análisis FISH que genera un ordenamiento aproximado de BAC y PAC en cromosomas humanos.

Ordenamiento mediante huellas digitales de los clones. El fragmento genómico insertado en un vector posee su propia secuencia única, que se puede utilizar para producir una huella digital de DNA. Por ejemplo, una digestión múltiple con enzimas de restricción genera una serie de bandas cuyo número y posición constituye una huella digital única, que es específica para ese clon. Las distintas bandas producidas por clones diferentes se pue-

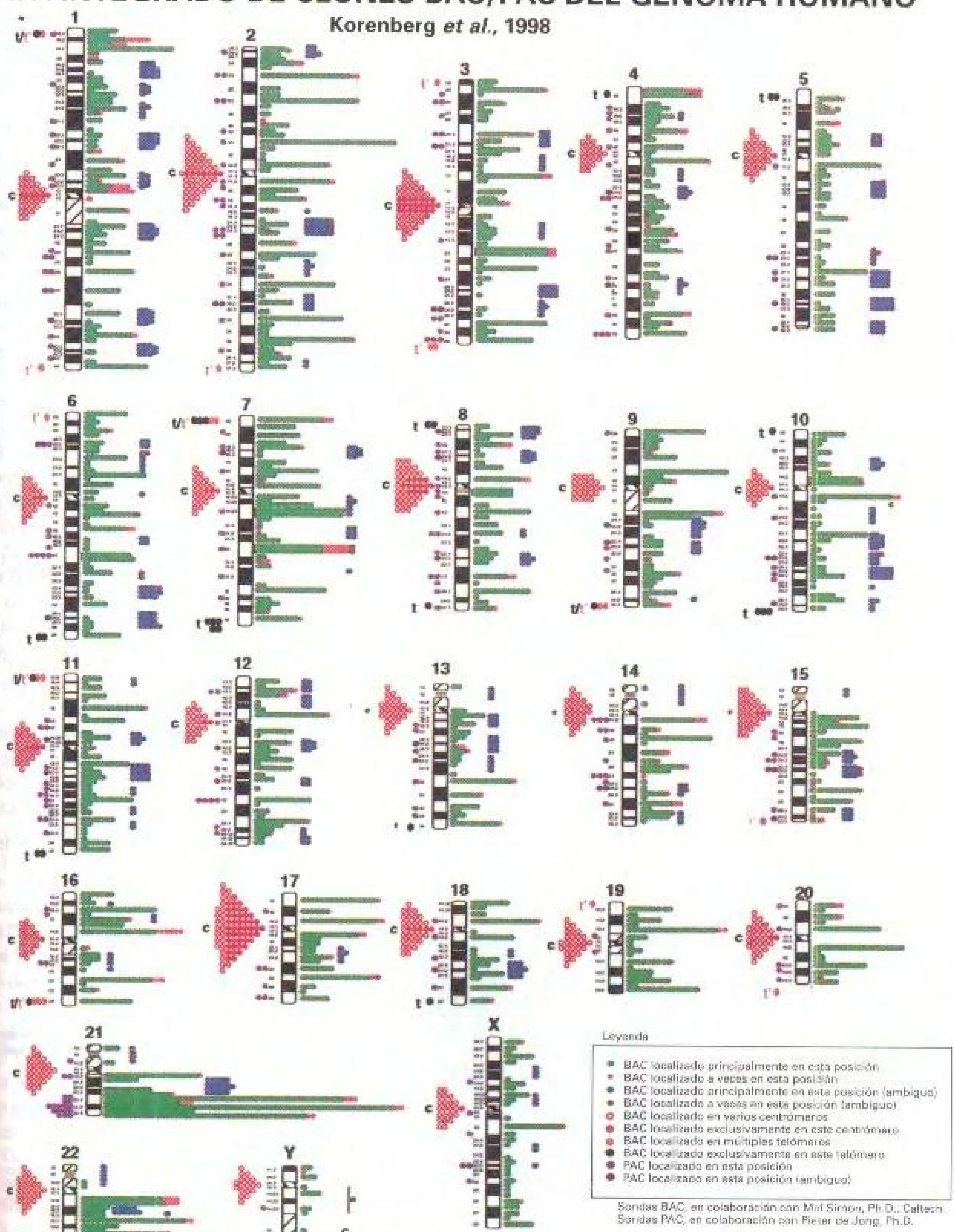
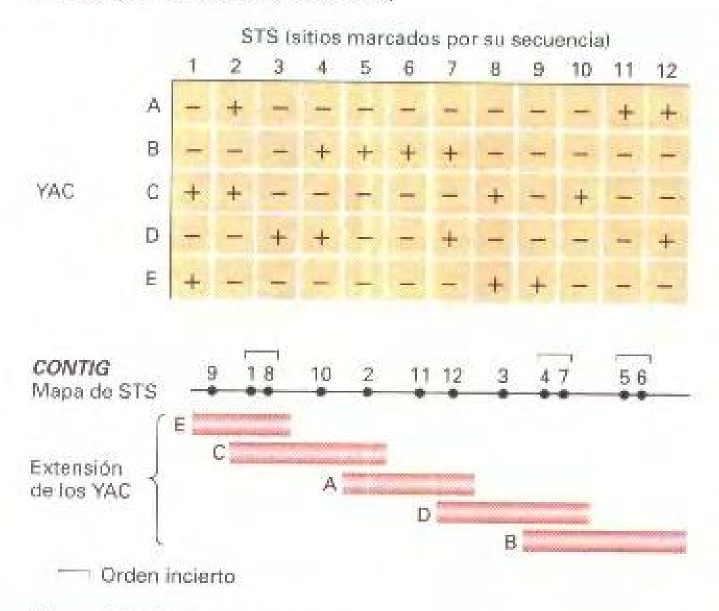


Figura 14-14. Ordenación de clones BAC y PAC mediante FISH. Cada color representa un tipo de vector; cada círculo representa la hibridación con un clon específico; las flechas rojas representan unión al centrómero de cada cromosoma. (Julie Korenberg, Ph.D., M.D. y Xiao-Ning Chen, M.D., Cedars Sinai Medical Center, Los Angeles, CA.)



YAC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
B	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−
C	+	+	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−
D	−	−	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+
E	+	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−

Figura 14-15. Utilización de sitios marcados por su secuencia (STS) para ordenar clones solapados (en este ejemplo, YAC) en un *contig*. Se analiza la presencia de los STS en cinco YAC distintos *(arriba)*, y se emplean estos datos para generar un mapa físico *(abajo)*.

den alinear, ya sea visualmente o empleando un programa de ordenador, para determinar si hay algún solapamiento entre los DNA insertados. De esta forma, se puede ensamblar el contig.

Ordenamiento mediante sitios marcados por su secuencia. Se pueden utilizar secuencias únicas de pequeño tamaño, contenidas en insertos grandes, como marcas para alinear varios clones en *contigs*. Por ejemplo, si un clon A tiene las marcas 1 y 2, y el clon B tiene las marcas 2 y 3, los dos clones deben solapar en la región de la marca 2. En la práctica, se acumula un conjunto numeroso de clones al azar con pequeños insertos genómicos (por ejemplo, clones en el fago λ) y se secuencian pequeñas regiones de cada clon. A partir de estas secuencias, se diseñan cebadores de PCR que amplificarán pequeñas secuencias concretas del DNA flanqueado por los cebadores. Estas secuencias cortas de DNA se conocen como **sitios marcados por su secuencia (STS**; del inglés, *sequence-tagged sites*). Aunque se desconoce inicialmente la posición de estos STS en el genoma, se puede utilizar un panel con muchos STS para caracterizar clones con grandes insertos genómicos (como los YAC). Los clones que tienen determinados STS en común deben presentar tramos que solapan y, por lo tanto, se pueden alinear en contigs. La Figura 14-15 muestra un ejemplo de este proceso.

Estas secuencias cortas se obtienen a veces de clones de cDNA, recibiendo entonces la denominación de **marcadores de secuencias expresadas (EST**; del inglés, *expressed sequence tags*). Los EST se obtienen mediante la secuenciación del inserto de cDNA, empleando para ello un cebador diseñado a partir de la secuencia

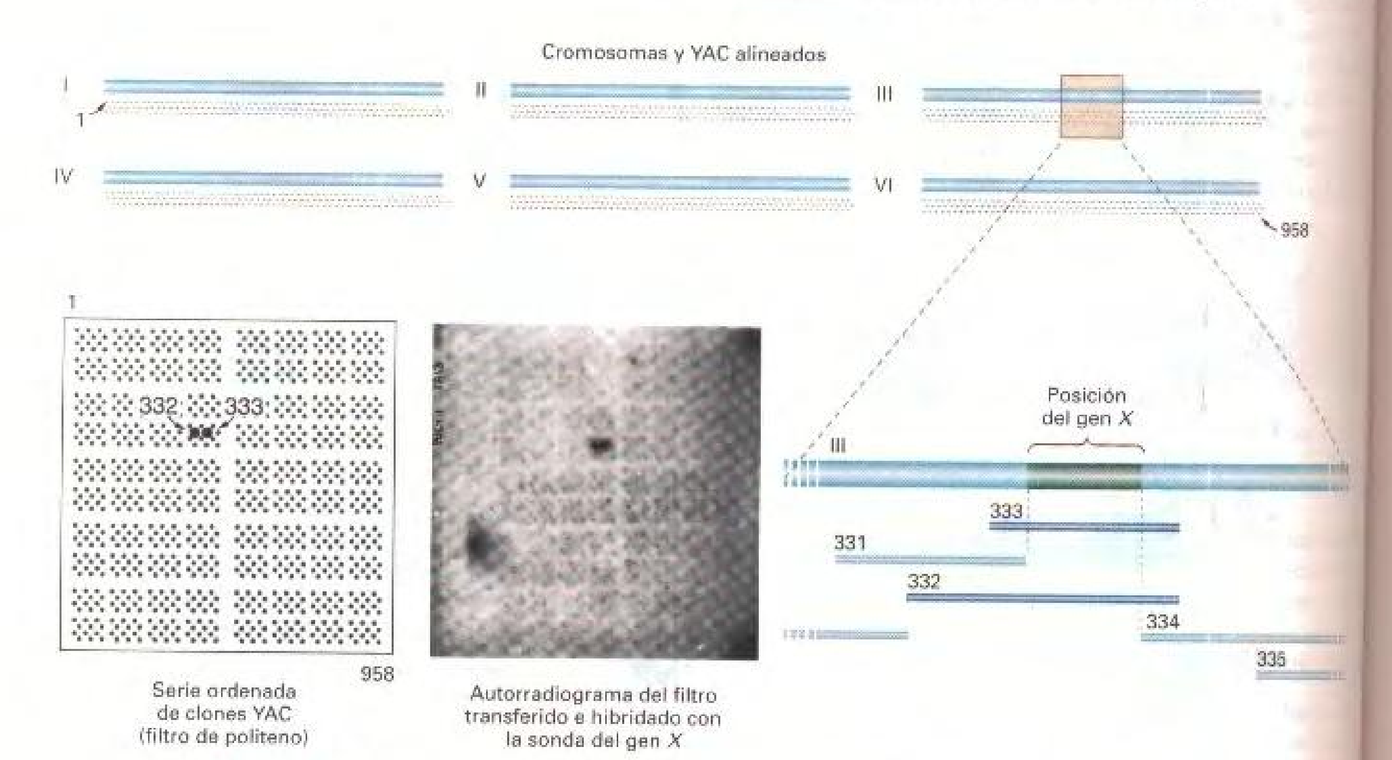


Figura 14-16. Utilización de una serie ordenada de YAC para localizar la posición en el mapa de un nuevo gen clonado de *Caenorhabditis elegans*. Los clones YAC se disponen en orden sobre un filtro de politeno. El DNA de este filtro se transfiere y se hibrida con el gen clonado, dando un autorradiograma con dos manchas positivas, que corresponden a dos YAC adyacentes numerados 332 y 333. De acuerdo con este patrón de hibridación, la localización del gen clonado queda reducida a una pequeña región del cromosoma III. (Autorradiograma de Alan Coulson.)

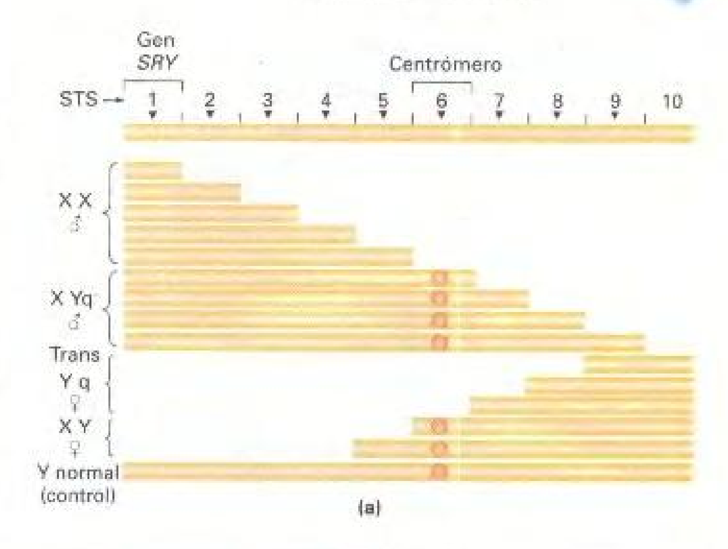
del vector. Se pueden utilizar para alinear los EST en los *contigs*, superponiendo así el mapa genético al mapa físico. Además, si en el EST está parte de la secuencia de lectura abierta (ORF; del inglés, *open reading frame*) del transcrito, la traducción «virtual» del ORF puede suministrar un «anticipo» de la función de la proteína cifrada por el mRNA a partir del cual se obtuvo el cDNA.

La combinación de estos métodos de cartografía física ha derivado en la clonación de los genomas completos de varios organismos. Por ejemplo, el genoma de *C. elegans* está ahora disponible en series de *contigs* de cósmidos o de YAC. Además, el DNA de los *contigs* se ha dispuesto de forma ordenada sobre filtros de nitrocelulosa; de manera que, para saber dónde se localiza en el genoma un fragmento concreto de DNA que sea de interés, basta con utilizar ese DNA como sonda sobre los filtros, y la detección de una señal positiva de hibridación indicará su posición precisa (Fig. 14-16).

Un ejemplo: clonación y cartografía del cromosoma Y humano. Varios de los cromosomas humanos más pequeños se han clonado por completo como series solapadas de YAC (*contigs* de YAC). Examinaremos la clonación del cromosoma Y como ejemplo, ya que ilustra varias de las técnicas de cartografía física. De hecho, el mapa de STS del cromosoma Y se obtuvo mediante dos métodos distintos, el alineamiento de YAC y el análisis de deleciones.

Alineamiento de YAC. La citometría de flujo permitió la obtención de una muestra de cromosomas Y, a partir de la cual se generaron clones de λ. Utilizando los que no contenían DNA repetido, se diseñaron cebadores de STS. En total, se fabricaron 160 cebadores. Se obtuvo una genoteca de YAC con 10 368 clones en los que el tamaño medio de los insertos era de unas 650 kb. Con estos números, se estimó que cada punto del cromosoma Y debía estar representado en la genoteca una media de cuatro veces. Los clones YAC se dividieron en 18 series de 576 YAC cada una, y se analizó cada serie con los cebadores STS. La subdivisión de las series positivas permitió asignar rápidamente cada STS particular a YAC concretos. Se determinó el contenido total de STS en cada YAC, y se establecieron los solapamientos entre los YAC de la misma forma que se muestra en el ejemplo general de la Figura 14-15.

Análisis de deleciones. Hay varios tipos de deleciones del cromosoma Y que ocurren de forma natural. Por ejemplo, algunos varones XX poseen fragmentos truncados del Y, mientras que algunas mujeres XY llevan deleciones de la región que contiene el gen de la masculinidad (determinante de testículos; véanse los Caps. 2 y 23). Estas deleciones del Y se mantuvieron en cultivos celulares y fueron la base del alineamiento de STS del cromosoma Y. Se probó cada deleción respecto de su contenido en STS. Dado que, de manera natural, las deleciones constituían una serie ordenada, se pudo utilizar su contenido en STS no sólo para elaborar un mapa de STS, sino también para cartografiar la extensión de las deleciones. La Figura 14-17 ilustra el método empleado. Los mapas de STS generados mediante el alineamiento de YAC y mediante el análisis de deleciones resultaron idénticos.



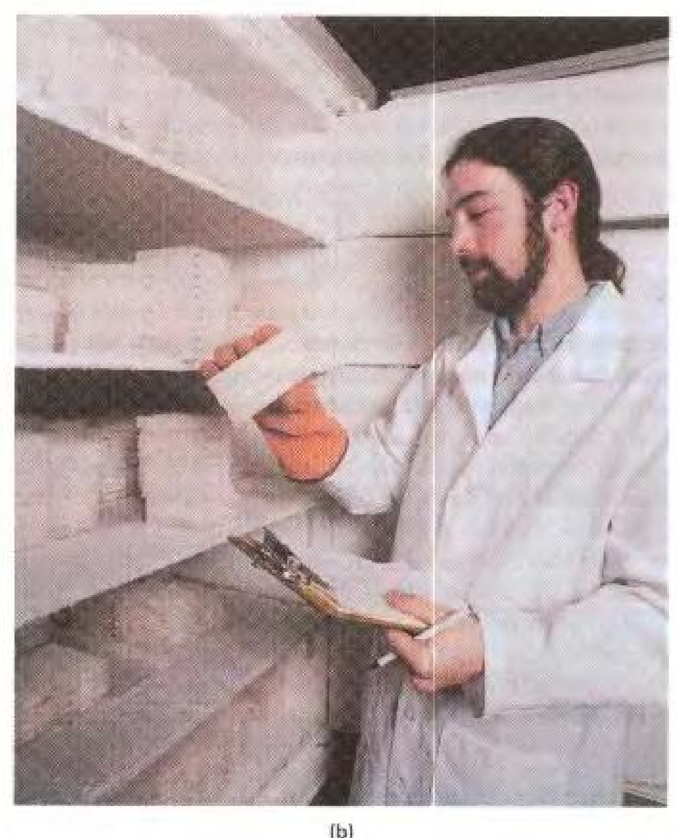

(b)

Figura 14-17. (a) La presencia de STS en fragmentos del cromosoma Y, aparecidos de forma natural, se utilizó para ordenar los STS en un mapa de dicho cromosoma. **Nota:** «q⁻» significa «carente del brazo q», «trans Yq» significa «translocación de Yq a un autosoma». (b) Ultracongelador con muestras de clones YAC empleados en el proyecto genoma humano (Parte b de Roger Bessmeyer — © 1995 Corbis. Reservados todos los derechos. Library of Human Genes.)

COROLARIO

Los clones se pueden ordenar en *contigs* confrontando sus huellas digitales de DNA, determinando la presencia de secuencias cortas en los segmentos clonados o analizando deleciones.



Figura 14-18. Aislamiento automático de DNA. (Cortesía de Fred Rick, Los Alamos National Laboratory, Los Álamos, Nuevo México.)

Secuenciación de los genomas

Se han empleado con éxito varias estrategias distintas en los proyectos genoma. Sus ventajas y desventajas dependen del tamaño y la complejidad del genoma, siendo de particular importancia la frecuencia de DNA repetido.

Secuenciación aleatoria de clones. El primer genoma en clonarse fue el de la bacteria *Haemophilus influenzae*. El DNA genómico se fragmentó mecánicamente y se utilizó para obtener una colección numerosa de clones aleatorios que se presumía debían solapar unos con otros de muchas formas. Se emplearon cebadores complementarios al DNA adyacente del vector para secuenciar regiones cortas de los extremos de los insertos de *Haemophilus* clonados. Luego, estas secuencias cortas se utilizaron (de manera parecida a los STS) para alinear los clones genómicos. Como se obtuvieron muchas secuencias aleatorias de pequeño tamaño, juntas abarcaban la mayor parte del genoma de *Haemophilus*. Los huecos se rellenaron mediante **«paseo con cebadores»**; esto es, empleando el extremo de una secuencia clonada como cebador para secuenciar tramos adyacentes no clonados.

Secuenciación de clones ordenados. La mayoría de los programas de secuenciación genómica comienzan con una serie ordenada de clones. Previamente, vimos cómo se generó una serie ordenada de clones YAC para el cromosoma Y y para otros cromosomas humanos. Sin embargo, los clones YAC no son adecuados para su secuenciación directa. Los YAC se subclonan en una serie de BAC o PAC solapados que, de nuevo, se alinean en *contigs* mediante STS o sus huellas digitales de DNA. A continuación, se subclonan los clones BAC o PAC en insertos más pequeños, que serán los que se secuencien. A este nivel, ya no se ordenan los clones, sino que se secuencian al azar múltiples insertos, de manera que cada clon BAC o PAC se secuencia por completo hasta un total de cinco veces.

Secuenciación de clones desordenados. Una estrategia empleada actualmente consiste en secuenciar los dos bordes de los fragmentos genómicos clonados con cebadores complementarios a los extremos del vector. Si la longitud de los tramos secuenciados y las de los fragmentos clonados son suficientemente grandes, se pueden reunir estas secuencias para formar largos tramos continuos de secuencia que pueden abarcar a los DNA repetidos contenidos en el genoma (Véanse los Caps. 3 y 20 para una discusión sobre los elementos transponibles y otros DNA repetidos). La ventaja de esta estrategia es que se elimina el tiempo y el esfuerzo del proceso de cartografía de los clones. Este tipo de secuenciación se está probando en la actualidad en el genoma de *Drosophila* y en el humano.

Automatización. Se pueden acelerar todos los pasos del análisis genómico mediante automatización. La preparación de los clones, el aislamiento de DNA, la electroforesis y los protocolos de secuenciación han sido todos ellos adaptados a máquinas. La Figura 14-18 muestra un ejemplo de esta maquinaria de alto rendimiento.

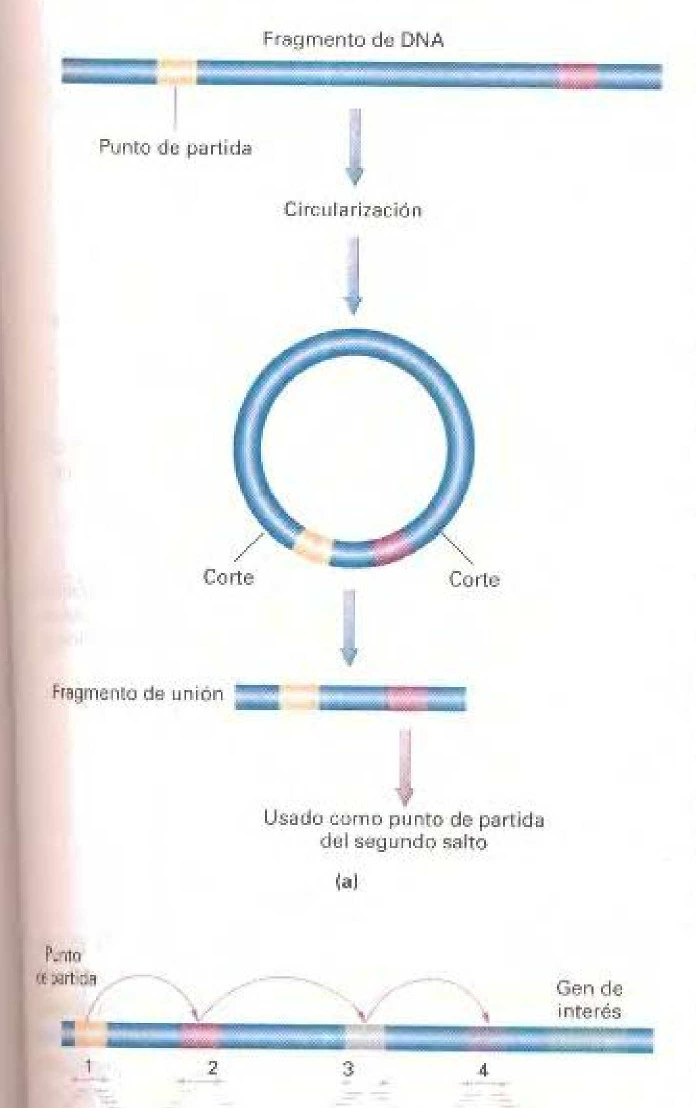
Utilización de los mapas genómicos en el análisis genético

Los mapas genéticos y físicos son un magnífico punto de partida para varios tipos de análisis genético, como el aislamiento de genes (incluidos los implicados en enfermedades genéticas humanas) y los estudios de Genómica funcional.

Aislamiento de genes de enfermedades humanas mediante clonación posicional. Consideraremos, como ejemplo, los métodos empleados para identificar la secuencia genómica del gen de la fibrosis quística (CF). Cuando se aisló el gen, no se conocía el defecto bioquímico causante de la enfermedad, de manera que se trataba de un gen a la búsqueda de una función. El ligamiento a marcadores moleculares había permitido localizar el gen en el brazo largo del cromosoma 7, entre las bandas 7q22 y 7q31.1. Los datos indicaban que el gen *CF* estaba dentro de esta región, flanqueado a un lado por el gen *met* (un proto-oncogén, véase el Cap. 22) y por el marcador molecular D788 al otro lado. No obstante, entre ambos marcadores hay 1.5 centimorgans (unidades de mapa) de DNA, un enorme tramo no cartografiado de 1.5 millones de bases. Se obtuvieron marcadores adicionales dentro de la región, utilizando sondas nuevas derivadas de una genoteca del cromosoma 7 elaborada empleando citometría de flujo.

Sin embargo, las dos técnicas claves que se utilizaron para recorrer grandes distancias genéticas fueron el paseo cromosómico (Cap. 13) y una técnica relacionada denominada **salto cromosómico**. La última técnica ofrece la posibilidad de saltar por encima de regiones inclonables de DNA, y genera marcas muy separadas a lo largo de la secuencia, que pueden emplearse como puntos de partida de paseos cromosómicos en ambas direcciones.

El salto cromosómico se ilustra en la Figura 14-19. En este método, se generan grandes fragmentos de DNA mediante la restricción parcial de la región en la que se piensa está el gen de interés. A continuación, se circulariza cada fragmento, quedando así unidos sus dos extremos entre sí. Se corta la zona de unión y se clona en un vector fágico que, junto con otras zonas de unión, constituyen una *genoteca de saltos*. Se utiliza una sonda del inicio del tramo de DNA en investigación para analizar la genoteca de saltos y encontrar el clon que contiene el extremo



igura 14-19. Manipulación de fragmentos genómicos clonados para ...izar un salto cromosómico, una versión modificada del paseo cromosómico, ...permite evitar regiones de difícil clonación, como las que contienen ...repetido (véase el texto.)

...ical. Cuando se encuentra este clon, se corta el otro extremo ...la región de unión y se utiliza para inspeccionar de nuevo la ...oteca y realizar un segundo salto. A partir de cada punto de ...lto pueden hacerse paseos cromosómicos en ambas direccio...es, en búsqueda de secuencias que parezcan genes.

Se obtuvo un mapa de restricción de toda la región que debía ...ntener el gen *CF*, utilizando enzimas de corte poco frecuente, ...los sitios de restricción se utilizaron para establecer la posición ...orientación de las secuencias obtenidas en los saltos y paseos ...omosómicos. Una vez obtenida la secuencia de un número de ...gmentos suficiente para cubrir zonas representativas de toda la ...gión, comenzó la caza de cualquier gen situado dentro de la ...isma. Los genes se buscaron mediante varias técnicas. En primer lugar, sabiendo que los genes humanos están normalmente precedidos en su extremo 5′ por ristras de citosinas y guaninas, denominadas *islas CpG*, se buscaron y encontraron varias de ellas. En segundo lugar, se razonó que un gen debía mostrar homología con el DNA de otros animales, debido a la conservación evolutiva, de manera que las secuencias candidatas se emplearon como sondas en lo que se denominó *zooblots*, análisis de hibridación de las sondas con DNA genómico de varios animales distintos. En tercer lugar, los genes deben tener señales apropiadas de inicio y fin de la traducción. En cuarto lugar, los genes se transcriben, por lo que deben detectarse los transcritos correspondientes.

Finalmente, se encontró un gen candidato que se extendía a lo largo de 250 kb de la región. Algunos síntomas de la CF se manifiestan en las glándulas sudoríparas; así que se preparó cDNA de células cultivadas de dichas glándulas, detectándose un cDNA de 6500 nucleótidos que era homólogo del gen candidato. Cuando se secuenció el cDNA de personas sanas y de enfermos de CF, se observó que el cDNA de éstos contenía una deleción de tres pares de bases que eliminaba una fenilalanina de la proteína. Por lo tanto, lo más probable era que esta región determinara la función afectada en la enfermedad. Así pues, se había encontrado el gen *CF*. De su secuencia nucleotídica se infirió la de aminoácidos; y a partir de ésta se predijo la estructura tridimensional de la proteína. Ésta resultó ser similar en estructura a las proteínas transportadoras de iones de otros sistemas, lo cual sugería que la causa principal de la enfermedad era un defecto en el transporte. Cuando se empleó el gen silvestre para transformar líneas celulares mutantes de enfermos de CF, se restableció la función normal. Siendo este «rescate» fenotípico la confirmación definitiva de que la secuencia aislada correspondía en realidad al gen *CF*.

Método del gen candidato. La clonación y caracterización intensiva de una región cromosómica revela inevitablemente la presencia de genes de función desconocida. Si un gen de interés, como el responsable de una enfermedad, se cartografía en dicha región, estas secuencias que parecen genes se convierten en **genes candidatos** a ser el implicado en la enfermedad. Esta estrategia para aislar un gen recibe la denominación de **método del gen candidato.** La información sobre datos fenotípicos, como un defecto bioquímico y el patrón de expresión tisular de la enfermedad, se puede confrontar con la presencia de ciertos dominios en la secuencia de la proteína y la expresión tisular del gen candidato.

COROLARIO

La clonación de un gen se ve facilitada por la disponibilidad de una serie de clones genómicos solapados.

Genes responsables de patrones de herencia complejos. La mayor parte de los fenotipos contrastados que se analizan en este libro están determinados *simplemente* por alelos de un solo gen. Sin embargo, muchos fenotipos están determinados de forma *compleja*. Aquí, vamos a distinguir dos situaciones.

En la primera de ellas, la variación fenotípica resulta ser cuantitativa (Caps. 1 y 25) y los caracteres (rasgos) se denominan **caracteres cuantitativos**. Ejemplos de éstos son los caracteres métricos, como la altura y el peso. Se cree que este tipo de variación se basa en el efecto acumulativo de alelos + y − de varios

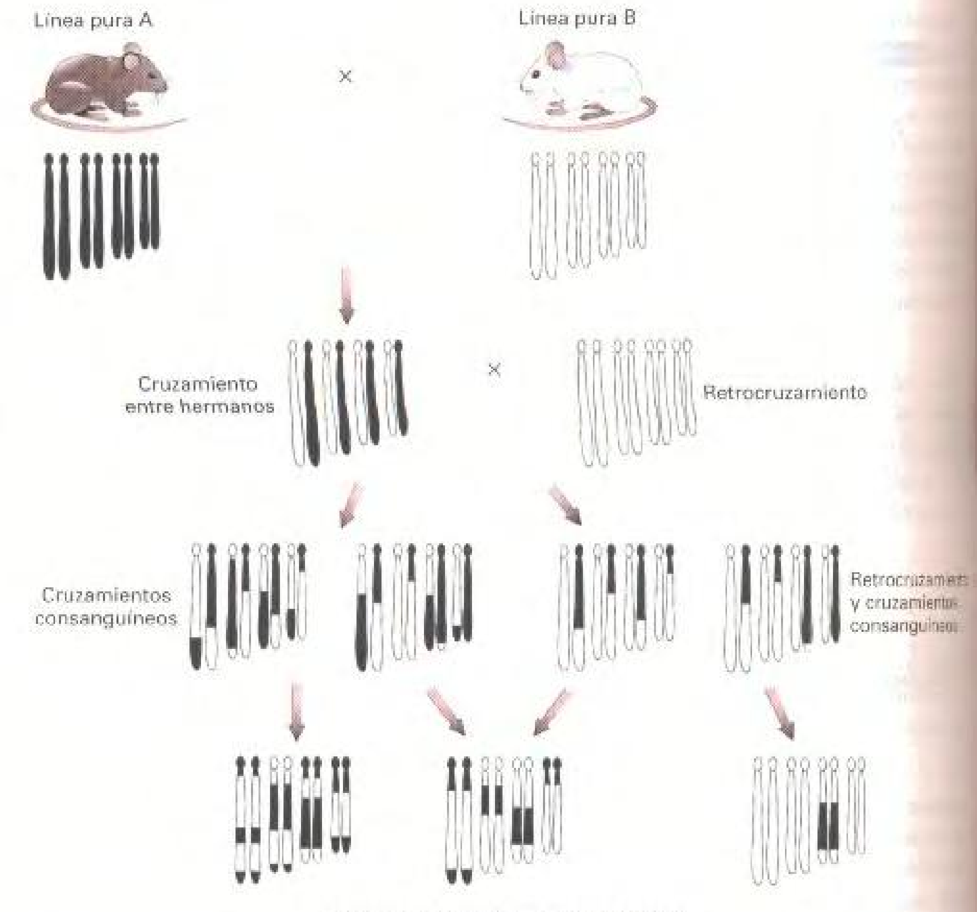


Figura 14-20. Obtención de líneas para la identificación y cartografía de QTL. Se cruzan dos líneas puras que difieren de forma significativa en algún carácter cuantitativo y, tras muchas generaciones de cruzamientos consanguíneos, se obtienen líneas puras recombinantes. La comparación de los fenotipos de estas líneas permite la identificación de segmentos cromosómicos concretos que contribuyen de forma consistente a la diferencia entre los parentales. Estas regiones contienen posibles QTL. (Basado en W. N. Frankel, «Taking Stock of Complex Trait Genetics in Mice», *Trends in Genetics* 12, 1995, Fig. 1.)

genes, y sus interacciones con el medio ambiente. La disponibilidad de miles de marcadores moleculares, como los SSLP, distribuidos a lo largo de todos los cromosomas del genoma, ha permitido cartografiar algunos de los genes que contribuyen a la variación cuantitativa de algún carácter. Los loci de estos genes reciben la denominación de **loci de caracteres cuantitativos**, abreviado **QTL** (del inglés, *Quantitative Trait Loci*). El procedimiento consiste en cruzar dos líneas puras que muestren fenotipos muy diferentes para un carácter cuantitativo, y cruzar entre sí los integrantes de las sucesivas generaciones descendientes hasta generar líneas descendientes homocigóticas (líneas consanguíneas recombinantes), que contienen un solo segmento, o un pequeño número de segmentos, de una de las líneas parentales, como se muestra en la Figura 14-20. (Estos segmentos se pueden identificar por los alelos SSLP que llevan). A continuación, estos descendientes se caracterizan respecto del fenotipo cuantitativo y se hacen estimas de la contribución (o falta de contribución) de segmentos concretos a la variación observada. El fenotipo medio de las líneas que llevan, digamos, la región A se compara con la media de las líneas que carecen de esa región. Si se observa alguna diferencia, la región A se convierte en candidata a contener un QTL. En una situación ideal, cada línea pura obtenida llevaría sólo un QTL. En ese caso, al cruzarla con el parental apropiado, este QTL segregaría de manera monohíbrida simple. El QTL puede entonces cartografiarse de forma precisa, analizando la recombinación con marcadores SSLP.

La segunda de las situaciones es un tipo de variación discontinua que no se hereda como un carácter mendeliano sencillo. Ejemplos de esto son los fenotipos del tipo todo o nada, como la epilepsia, las enfermedades coronarias, la diabetes y la enfermedad de Alzheimer. Aquí, el modelo de herencia se basa de nuevo en la contribución de los alelos de varios genes, con una componente de interacción ambiental muy importante. Sin embargo, para producir los fenotipos discontinuos, estos factores parecen contribuir a un tipo de «umbral» celular o del organismo completo por encima del cual se manifiesta la enfermedad. Los genes implicados se pueden caracterizar utilizando el método mostrado en la Figura 14-20. Ya se han identificado varios genes que contribuyen a caracteres complejos, tanto en organismos experimentales como en la especie humana. En los seres humanos, los estudios realizados en poblaciones aisladas, con poca variación genética, resultan de particular utilidad en la identificación de los loci génicos implicados. En el futuro, el análisis con SNP promete acelerar la cartografía de los caracteres complejos.

Genómica funcional

Los datos de la secuenciación a gran escala son el comienzo de la Genómica funcional. Las siguientes secciones muestran algunos de los análisis que se pueden realizar para investigar la función.

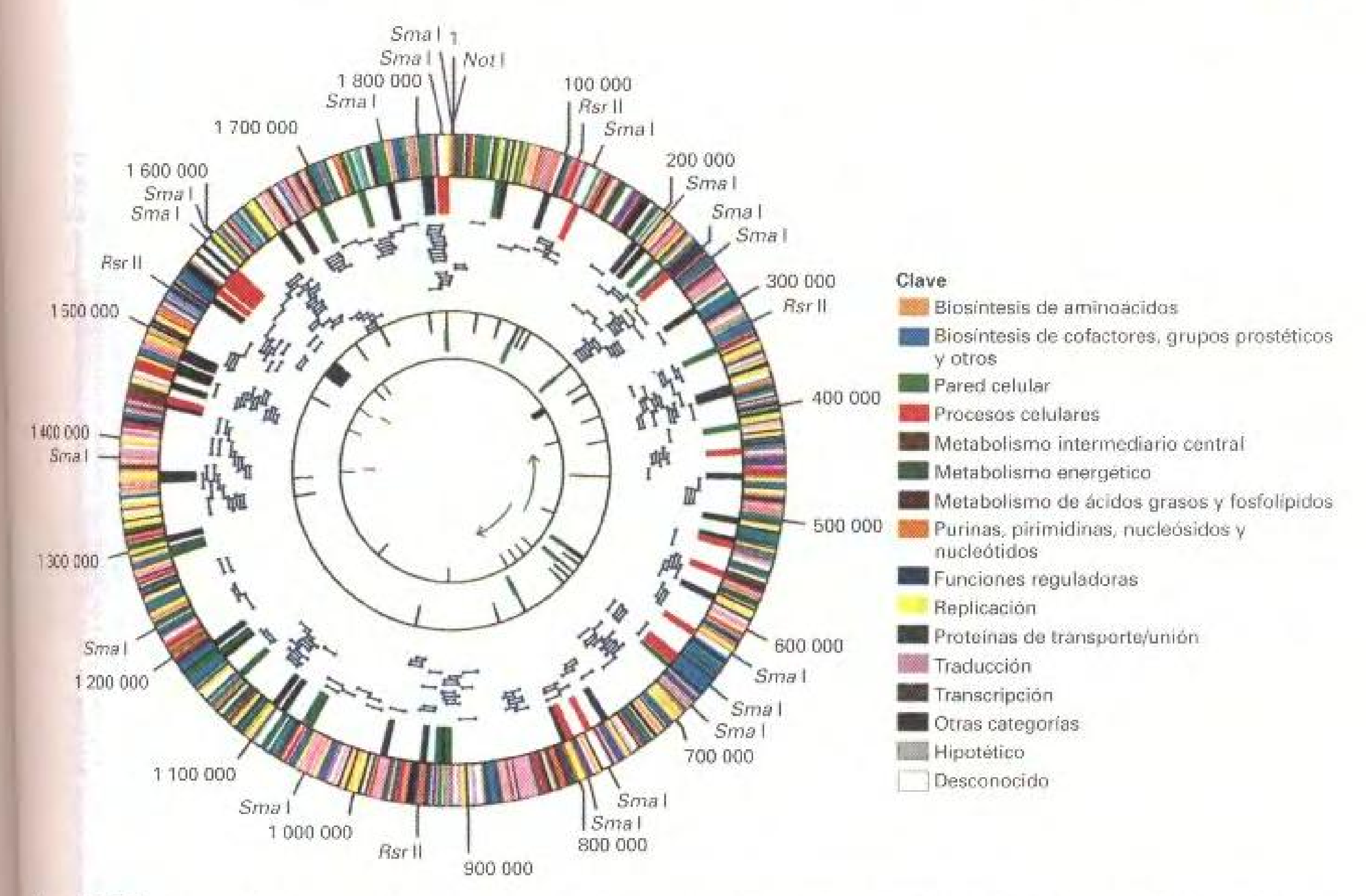


Figura 14-21. Organización del genoma de la bacteria *Haemophilus influenzae*, basada en la secuencia genómica completa publicada en 1995. Los círculos, desde fuera hacia dentro, tienen los significados siguientes:

- Dianas de restricción y posiciones genómicas, comenzando en la diana de *Not*I.
- Genes coloreados de acuerdo con el grupo funcional al que pertenecen (véase la clave).
- Regiones con alto contenido en GC: rojo > 42 %; azul > 40 %. Regiones con alto contenido en AT: negro > 66 %; verde > 64 %.
- Cobertura de algunos clones empleados en el proyecto de secuenciación.
- Operones ribosómicos (verde), tRNA (negro), profagos de tipo μ (azul).
- Posiciones de las repeticiones en tándem de secuencias sencillas.
- Orígenes de replicación (flechas verdes) y secuencias de terminación (rojo).

(Ilustración del Dr. Anthony R. Kerlavage: Institute for Genomic Research. Tomado de R. D. Fleischmann et al., «Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae* Rd», *Science* 1995, 269, 496-512.)

Caracterización del proteoma mediante análisis de ORF

La secuencia de DNA genómico se analiza con programas de ordenador capaces de predecir la existencia de los genes. Entre otras cosas, estos programas examinan cada una de las seis fases de lectura de todas las secuencias y buscan segmentos que comiencen con el codón AUG, de inicio de la traducción, y terminen con uno de los codones fin de mensaje. Cualquier secuencia de lectura abierta con al menos 100 codones es considerado como un posible gen. La mayoría de los ORF son completamente nuevos, sin que correspondan a algún gen conocido cuyos efectos generen fenotipos identificables. Inicialmente, la función de un ORF se puede analizar empleando el ordenador para explorar las bases de datos en búsqueda de homología total o parcial con genes caracterizados en otros organismos. La localización, orientación y agrupamiento de los ORF constituye también una información genómica de interés. Las Figuras 14-21 y 14-22 muestran ejemplos de *Haemophilus* y *Saccharomyces*. Como se muestra en la Figura 14-23, de tales análisis se puede deducir una distribución provisional de los genes que determinan proteínas. En los eucariotas superiores, en los que los intrones son una característica común de los genes, la predicción de los ORF a partir del DNA genómico es más difícil.

Interrupción de genes: *knockouts*

La función de los ORF se puede investigar mediante la interrupción sistemática de los genes en los *knockouts*. Esto se consigue con mutagénesis *in vitro* y la búsqueda de cualquier fenotipo mutante que pudiera ofrecer pistas sobre la función. Este procedimiento se está empleando en genomas secuenciados por com-

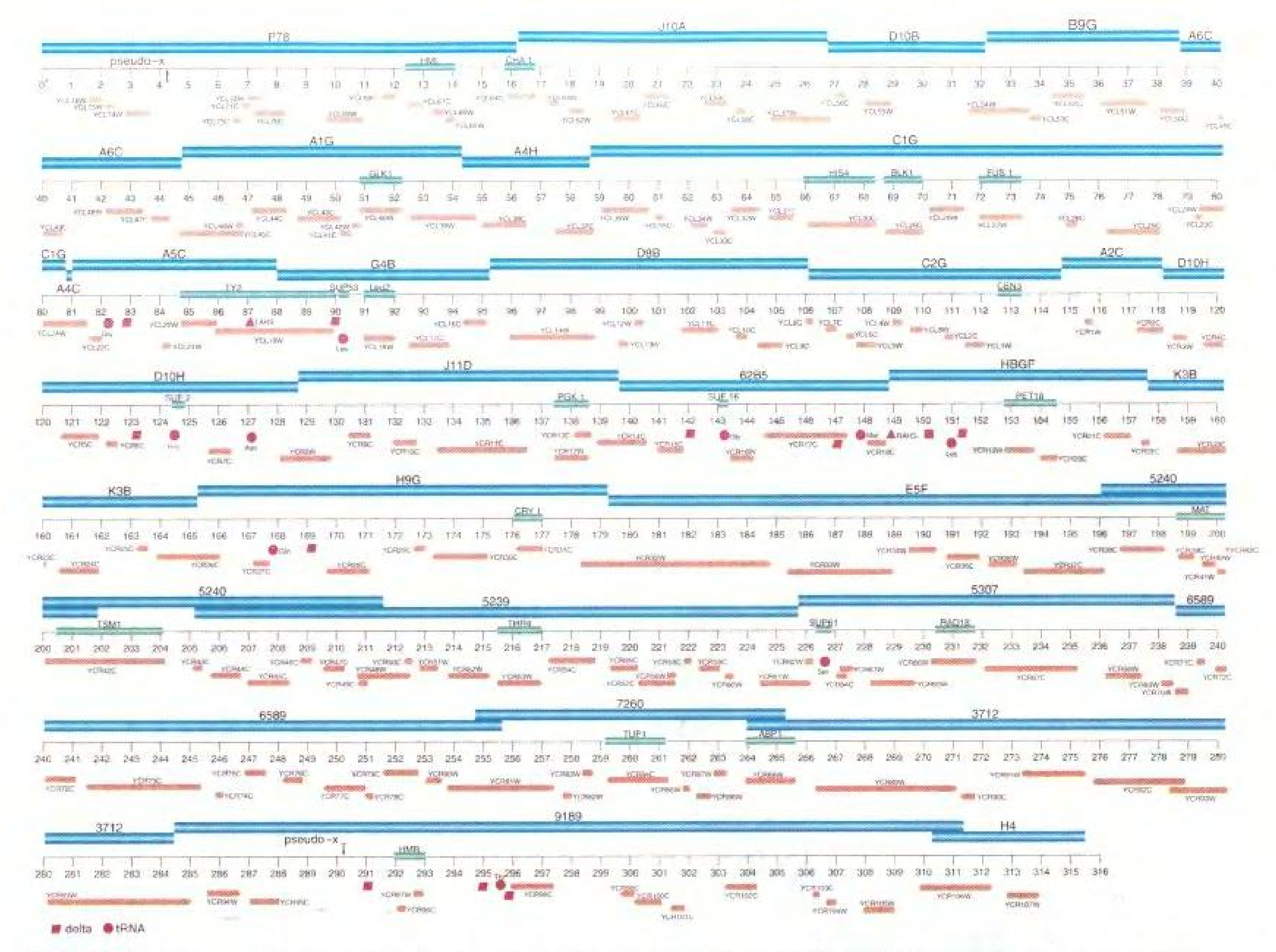


Figura 14-22. Aspecto general del cromosoma 3 de levadura, de acuerdo con la información obtenida de la secuenciación completa del cromosoma. Los genes conocidos previamente por sus fenotipos mutantes se muestran en color verde. Las secuencias de lectura abierta, que probablemente corresponden a genes que determinan proteínas, se detectaron tras el análisis de la secuencia y se indican debajo de la línea en color naranja. Los clones utilizados en la secuenciación aparecen encima de la línea, en color azul. Las secuencias delta derivan del transposón *Ty*. (S. G. Oliver et al., *Nature* 357, 1992, 38-46.)

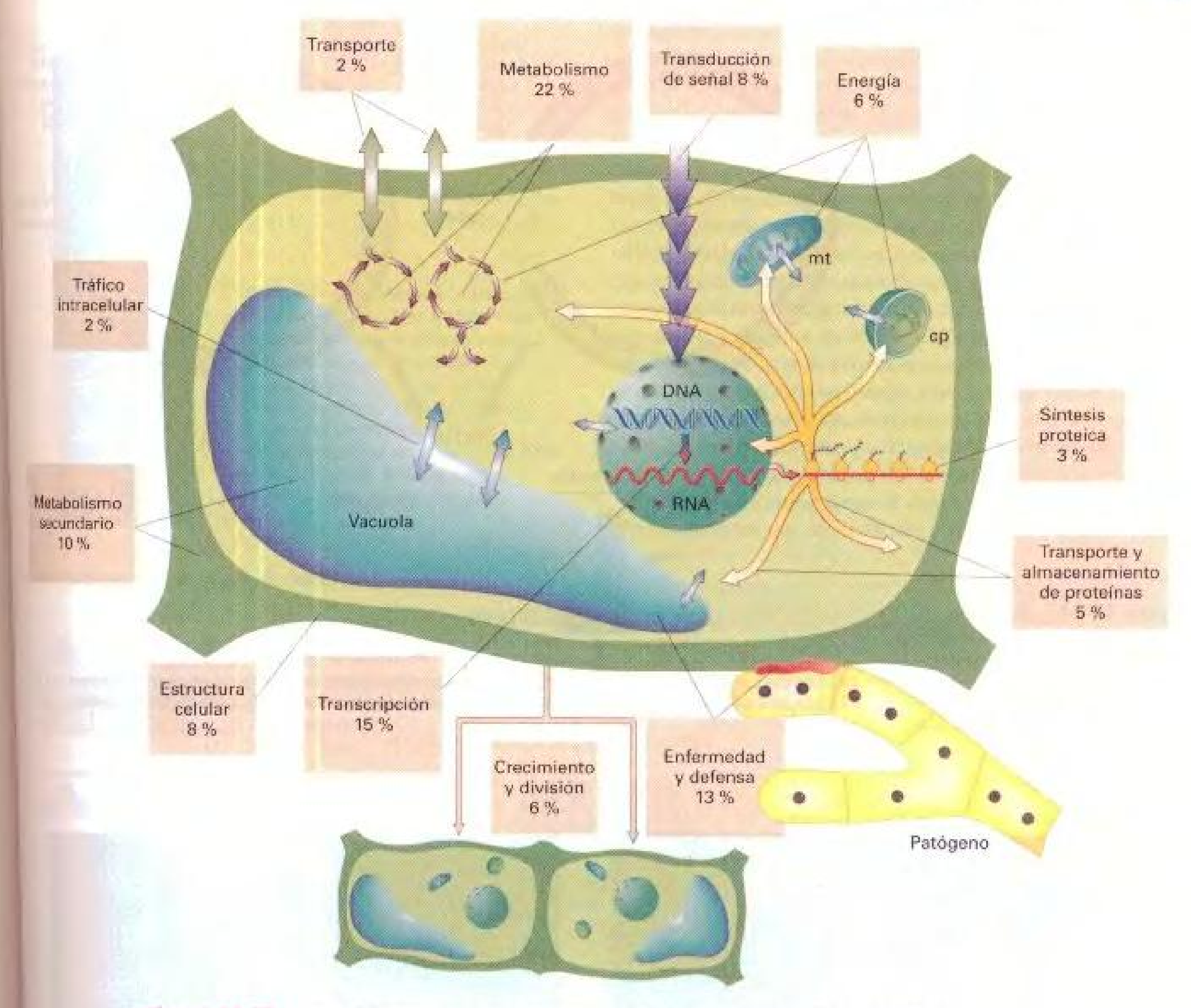


Figura 14-23. Distribuciones de varias categorías de genes que determinan proteínas. La estimación se ha hecho a partir de los genes de la planta *Arabidopsis thaliana* que conocemos en la actualidad.

Resulta interesante señalar que, cuando se interrumpen, muchos ORF no muestran efectos fenotípicos. Más de la mitad de los ORF predichos se incluyen en esta categoría.

Estudio de interacciones génicas mediante el sistema del doble híbrido de levadura

Este método investiga interacciones utilizando un sistema basado en dos plásmidos de levadura. La prueba se basa en el activador transcripcional GAL4 de levadura. Esta proteína consta de dos dominios, uno de unión al DNA y otro activador, que deben estar en estrecha conexión para que este activador inicie la transcripción. En un plásmido que actúa como «cebo», se une el gen de la proteína en estudio al tramo de GAL4 que determina el dominio de unión al DNA. En otro plásmido, el gen de otra proteína en estudio se coloca junto al tramo de GAL4 que determina el dominio activador; esta proteína recibe la denominación de «presa» (Fig. 14-24). A continuación, los dos plásmidos se introducen en la misma célula. Una forma de conseguirlo es cruzando dos células haploides, una que contiene el cebo y la otra la presa. La única forma de que los dominios de unión a DNA y de activación entren en contacto es que las dos proteínas, cebo y presa, se unan entre sí, poniendo de manifiesto una interacción física. El sistema del doble híbrido puede automatizarse para facilitar la búsqueda a gran escala de interacciones entre proteínas de todo el proteoma.

Utilización de *chips* de DNA para estudios de regulación génica durante el desarrollo

Los *chips* de DNA van a revolucionar la Genética, de la misma manera que los *chips* de silicio revolucionaron la industria de los ordenadores. Los *chips* de DNA son muestras de DNA dispuestas en formaciones ordenadas y unidas a un *chip* de cristal del tamaño de un cubreobjetos de microscopio.

A continuación, se indica un posible protocolo. Máquinas robotizadas con múltiples inyectores, como las puntas de una pluma

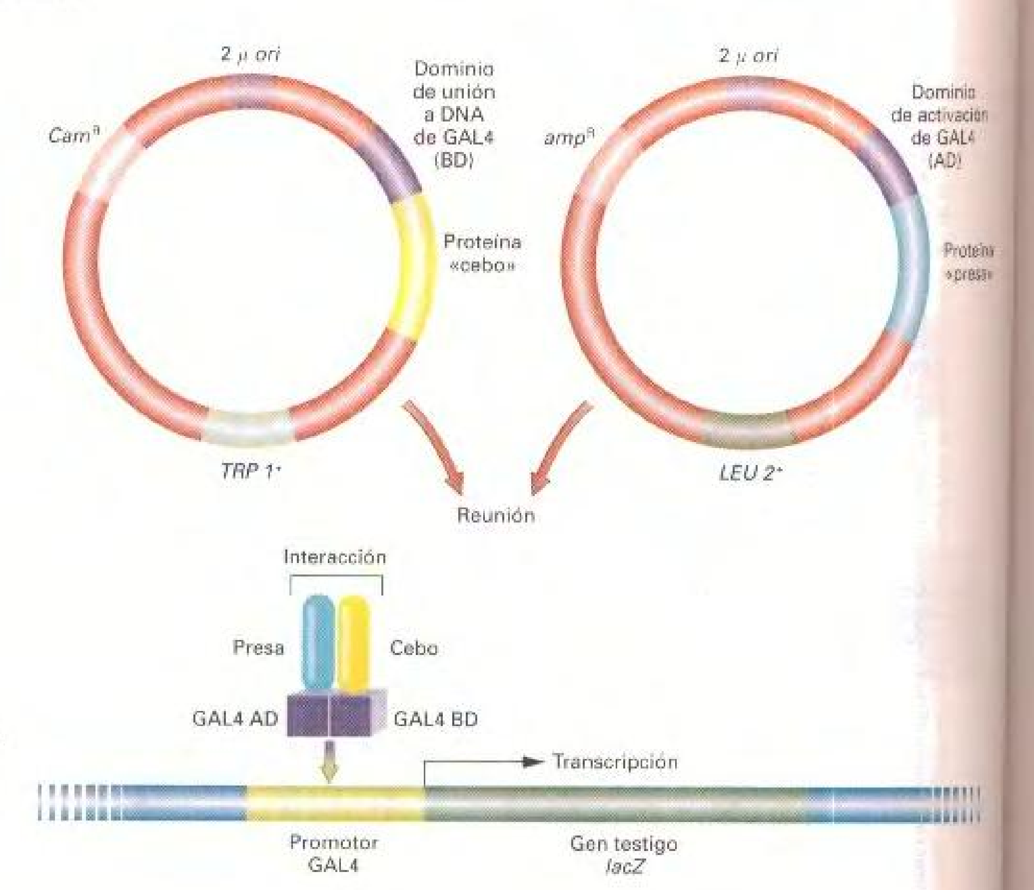


Figura 14-24. Sistema del doble híbrido de levadura para la detección de interacciones génicas. El sistema aprovecha la unión de dos proteínas para detectar la restauración de la actividad de la proteína GAL4, que activa un gen testigo.

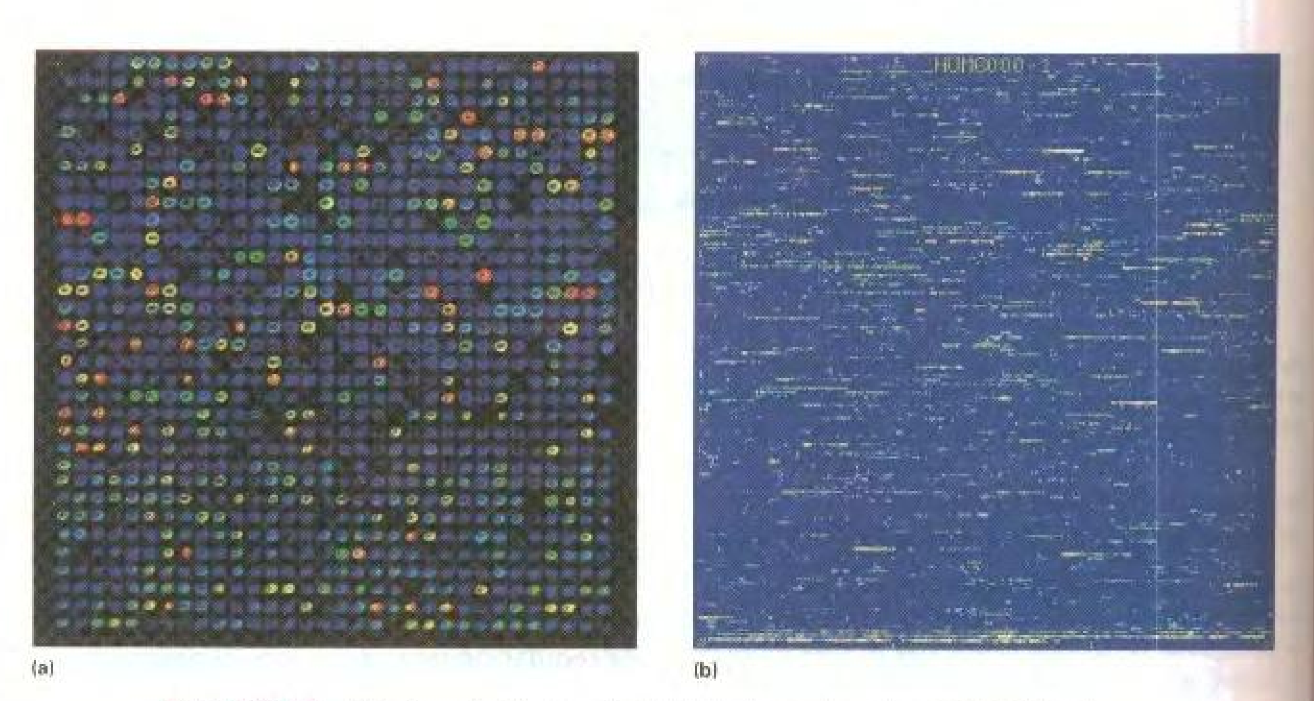


Figura 14-25. Detección mediante fluorescencia de la hibridación con micromatrices (*chips*) de DNA. (a) Serie ordenada de 1046 cDNA hibridados con sondas de cDNA obtenidas a partir de médula ósea. La intensidad de la señal sigue los colores del espectro visible, siendo el color rojo la señal más intensa y el azul la más débil. (b) *GeneChip* de Affymetrix. Serie ordenada de 65 000 oligonucleótidos, representativos de 1641 genes, que se han hibridado con sondas de cDNA específicos de un tejido. (Parte a por cortesía de Max Scheria, Stanford; imagen aparecida en *Nature Genetics*, 16, 1997, 127, Figura 1*a*. Parte *b* por cortesía de Affymetrix Inc., Santa Clara, CA. Imagen generada por David Lockhart. Affymetrix y GeneChip son marcas estadounidenses registradas por Affymetrix. Esta imagen se publicó en *Nature Genetics*, 16, 1997, 127, Figura 1*b*.)



Figura 14-26. Patrones de expresión génica detectados con *chips* de DNA. Cada fila corresponde a un gen diferente y cada columna a un momento distinto de desarrollo. El color rojo indica «activo», y el verde «inactivo». Las cuatro columnas marcadas +cyc corresponden a células cultivadas en presencia de cicloheximida. (Mike Eisen and Vishy Iyer, Stanford; imagen publicada en *Nature Genetics* 18, 1998, 196, Figura 1.)

estilográfica en miniatura, descargan gotas microscópicas de una solución de DNA en posiciones específicas (direcciones) del *chip*. Se seca el DNA y se trata de forma que quede unido al cristal, pudiéndose aplicar miles de muestras sobre un *chip*. Normalmente, las muestras de DNA corresponden a los cDNA de distintos genes; y, en principio, sería posible disponer de forma ordenada todos los cDNA de un genoma completo en unos cuantos *chips*. Los *chips* se exponen a cDNA marcados, sintetizados a partir de mRNA total aislado en una fase concreta de desarrollo. Se utilizan marcas fluorescentes, y la unión de las moléculas de la sonda a los *chips* se analiza de forma automática con un haz de rayos láser. La Figura 14-25*a* muestra un resultado típico. De esta forma, se puede saber qué genes están activos en cualquier fase del desarrollo o en cualquier condición ambiental. Una vez más, la idea es identificar redes de proteínas que están activas en la célula en cualquier situación que nos interese. La Figura 14-26 muestra un ejemplo de expresión génica secuencial durante el desarrollo.

En otro protocolo se carga el *chip* con una serie ordenada de oligonucleótidos que se sintetizan, nucleótido a nucleótido, so-

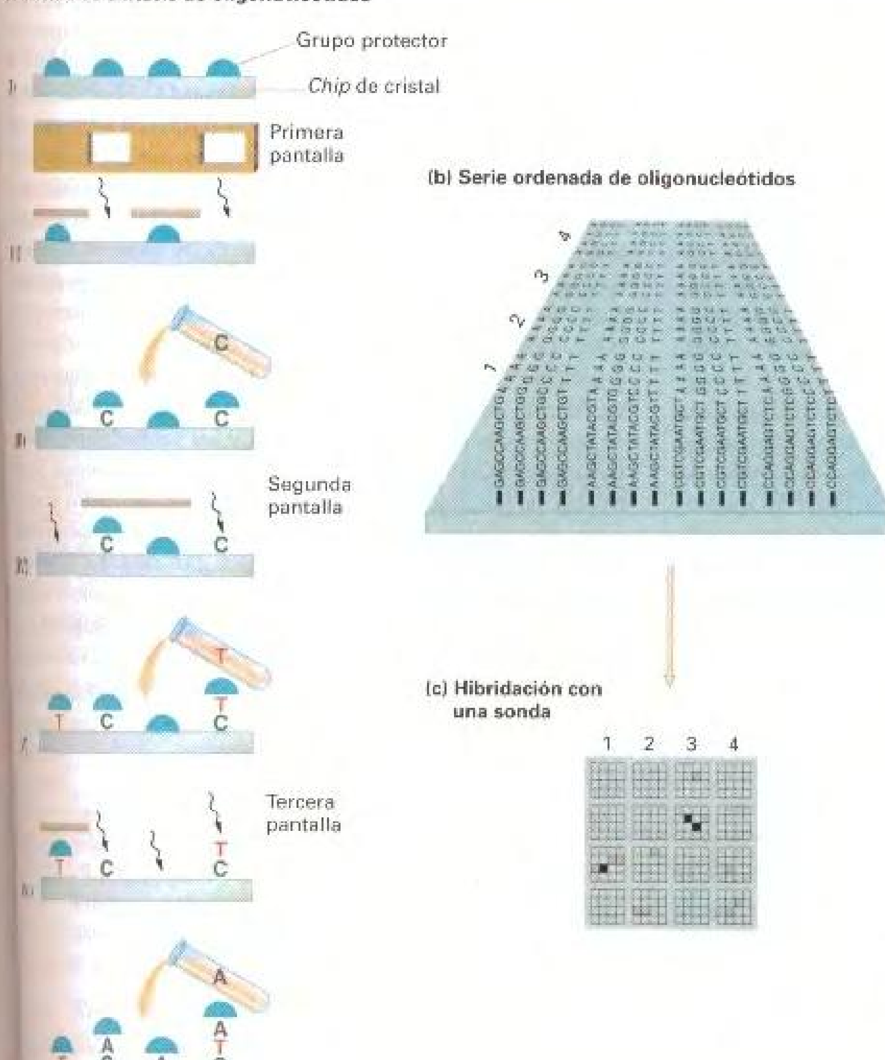


Figura 14-27. Método para sintetizar una serie ordenada de muchos oligonucleótidos sobre un *chip* de cristal. Los nucleótidos se depositan, uno a uno, en posiciones activadas mediante la iluminación a través de una pantalla protectora con agujeros dispuestos en un patrón determinado. Cada nucleótido lleva un grupo que bloquea la polimerización posterior, a menos que sea activado por luz.

bre el propio *chip* (Fig. 14-27). Primero, se recubre el cristal con una capa de grupos químicos protectores que impiden la unión del DNA. A continuación, se coloca sobre el cristal una pantalla con agujeros que corresponden a los sitios en los que se va a depositar el DNA. Se envía entonces un haz de rayos láser que pasa a través de los agujeros donde tiene que empezar la síntesis. El láser elimina los grupos protectores. Luego, se baña el cristal con una solución del primer nucleótido que se desea depositar. Cada nucleótido lleva su propio grupo protector, que se puede eliminar para una segunda ronda de incorporación de nucleótidos. Así, mediante la aplicación secuencial de las pantallas con los agujeros apropiados y las soluciones adecuadas, se pueden preparar series ordenadas de diferentes oligonucleótidos. Para estudiar la función del genoma, estos nucleótidos pueden ser secuencias características de genes, como los EST. Como en el ejemplo anterior, el *chip* completo se baña con la sonda fluorescente. La Figura 14-25*b* muestra la unión de una sonda heterogénea a una serie ordenada de oligonucleótidos.

Advierta que estos métodos con series ordenadas de DNA representan básicamente una estrategia de disección genética que supone una alternativa al análisis mutacional. El objetivo de ambas metodologías es definir el conjunto de genes o proteínas que son importantes para cualquier proceso concreto en estudio. El análisis mutacional tradicional lo consigue acumulando mutaciones que alteren dicho proceso; la tecnología de los *chips* lo hace detectando los mRNA concretos que se transcriben en el proceso.

Los *chips* de DNA se pueden utilizar también para detectar mutaciones. Se preparan oligonucleótidos complementarios a todos los cambios mutacionales sencillos en una región genética de interés. Alternativamente, se pueden ordenar en el *chip* oligonucleótidos complementarios a todas las mutaciones conocidas de un gen humano (como, p. ej., uno que sea responsable del cáncer de mama).

RESUMEN

La Genómica es la rama de la Genética que tiene como objetivo la caracterización molecular sistemática de los genomas. Algunos de sus métodos son procedimientos tradicionales de cartografía genética; pero, además, se han desarrollado técnicas especializadas para la manipulación de las grandes cantidades de DNA de los genomas. El análisis genómico es importante por dos razones: (1) resulta una forma de obtener una visión general de la arquitectura genética de un organismo, y (2) genera un conjunto de información básica que puede emplearse para encontrar nuevos genes, como los responsables de las enfermedades humanas. El análisis genómico parte normalmente de métodos de baja resolución para avanzar hasta técnicas de mayor poder resolutivo. Inicialmente, hay que asignar genes a cromosomas, lo que se puede conseguir con una variedad de técnicas que incluyen el ligamiento a marcadores estándares, hibridación *in situ*, electroforesis en campo pulsante, estudios de híbridos de células hombre-ratón. El orden de los loci a lo largo del cromosoma se puede determinar mediante varios tipos de cartografía por recombinación meiótica y (en la especie humana) con híbridos irradiados con rayos X. De particular utilidad son los marcadores moleculares, que pueden rellenar los huecos entre genes asociados a fenotipos concretos. Los RFLP, los SSLP y los RAPD proporcionan loci heterocigóticos que pueden emplearse en cartografía como marcadores moleculares.

El mayor grado de resolución genómica es la cartografía física de fragmentos de DNA. Los más útiles son los fragmentos que se han clonado en vectores que llevan grandes insertos de DNA, como los cósmidos, los YAC y los BAC. El objetivo de la cartografía física es producir una serie de clones solapados que cubran un cromosoma entero o el genoma completo. Los sitios marcados por su secuencia (STS) son particularmente útiles para alinear en *contigs* los cósmidos que solapen. Conforme se caracterizan más clones, los *contigs* crecen hasta alcanzar el tamaño de cromosomas enteros. Los marcadores de secuencias expresadas (EST) sirven para situar genes funcionales en el mapa genómico. Los mapas genómicos se han empleado en la clonación posicional de genes involucrados en enfermedades humanas y de función desconocida. Los mapas han proporcionado puntos de partida adecuados para los paseos y los saltos cromosómicos. La secuenciación genómica revela a menudo la presencia de genes que no han sido nunca asociados a un fenotipo; estos genes se tienen que estudiar mediante interrupción génica y la subsiguiente comprobación de los posibles fenotipos mutantes. La Genómica funcional utiliza toda una variedad de estrategias, como la definición de todos los ORF, la interrupción de genes (*knockouts*) para determinar la función, el sistema de dos híbridos de levadura para establecer interacciones génicas y las micromatrices (*chips*) de DNA para establecer qué genes se transcriben.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

contig / mapa físico / YAC / BAC / RFLP / SSLP / STS / EST / FISH / frecuencia de recombinación / marcador molecular

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

Una genetista que trabaja con *Neurospora* acaba de aislar una nueva mutación que provoca insensibilidad al aluminio (*al*) en una estirpe de la variedad Oak Ridge (véase la pág. 406). La investigadora desea aislar el gen mediante clonación posicional

y, por tanto, necesita cartografiarlo. Por razones en las que no precisamos entrar, sospecha que está situado cerca del extremo del brazo derecho del cromosoma 4. Por fortuna, cerca de esa región, hay tres marcadores RFLP (1, 2 y 3) disponibles, así que realiza el cruzamiento siguiente:

al (variedad Oak Ridge) × al^+ (variedad Mauriceville)

La investigadora aísla cien descendientes y los analiza respecto a los dos alelos *al* y los seis alelos RFLP: 1^O, 2^O, 3°, 1^M, 2^M y 3^M. Los resultados son los siguientes, donde O y M representan los alelos RFLP, y *al* y + los alelos *al* y al^+:

RFLP1	O	M	O	M	O	M
RFLP2	O	M	M	O	O	M
RFLP3	O	M	M	O	M	O
locus *al*	*al*	+	*al*	+	*al*	+
Total del genotipo	34	36	6	4	12	8

a. ¿Se encuentra, de hecho, el locus *al* en esta región?

b. Si es así, ¿a qué RFLP está más cercano?

c. ¿Cuántas unidades de mapa separan los tres loci RFLP?

♦ Solución ♦

Se trata de un problema de cartografía, si bien con la peculiaridad de que uno de los marcadores es de los llamados clásicos (que hemos tratado en los capítulos anteriores) y los otros son marcadores moleculares (RFLP, en este caso). No obstante, el principio metodológico para la cartografía es el mismo que empleamos con anterioridad; en otras palabras, se basa en las frecuencias de recombinación. En cualquier análisis de recombinación, debemos estar seguros de los genotipos de los parentales antes de clasificar la descendencia en clases recombinantes. En este caso, sabemos que el parental Oak Ridge debe aportar los alelos O y el Mauriceville los alelos M; por tanto, los parentales eran:

$$al\ 1^O\ 2^O\ 3^O \times +\ 1^M\ 2^M\ 3^M$$

y saber esto hace más fácil la determinación de las clases recombinantes. Vemos en los datos que las clases parentales son las más comunes (34 y 36). En primer lugar, observamos que los alelos *al* están estrechamente ligados al RFLP 1 (todos los descendientes son *al* 1^O o + 1^M). Por lo tanto, el locus *al* está definitivamente situado en esta región del cromosoma 4. Hay 6 + 4 = 10 recombinantes entre los RFLP 1 y 2, de manera que estos loci están a una distancia de 10 unidades de mapa. Hay 12 + 8 = 20 recombinantes entre los RFLP 2 y 3; esto es, están a una distancia de 20 unidades de mapa. Hay 6 + 4 + 12 + 8 = 30 recombinantes entre los RFLP 1 y 3, lo que implica que estos loci flanquean al RFLP 2. Por tanto, el mapa es:

al RFLP 1 10 m.u. RFLP 2 20 m.u. RFLP 3

Resulta evidente que no hay dobles recombinantes, que habrían sido del tipo M O M y O M O.

Observe que no hemos empleado ningún principio nuevo en la resolución de este problema; el verdadero reto está en comprender la naturaleza de los RFLP y traducir esta comprensión en genotipos con los que analizar la recombinación. Si todavía no comprende la naturaleza de los RFLP, debería preguntarse a sí mismo cómo se analizan experimentalmente los alelos RFLP.

Problemas Resueltos

1. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad humana de carácter recesivo y ligada al X que afecta a los músculos. Seis niños pequeños padecen DMD, junto a varias otras afecciones, y se observa que tienen pequeñas deleciones en el cromosoma X, como se muestra a continuación:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Δ i
Δ ii
Δ iii
Δ iv
Δ v
Δ vi

a. En base a esta información, ¿qué región cromosómica es la que, con mayor probabilidad, contiene el gen responsable de la DMD?

b. ¿Por qué los niños muestran otros síntomas, además de la DMD?

c. ¿Cómo utilizaría muestras de DNA de estos seis niños y de niños no afectados para obtener una muestra de DNA enriquecida en el gen de la DMD, como paso previo a la clonación del gen?

♦ Solución ♦

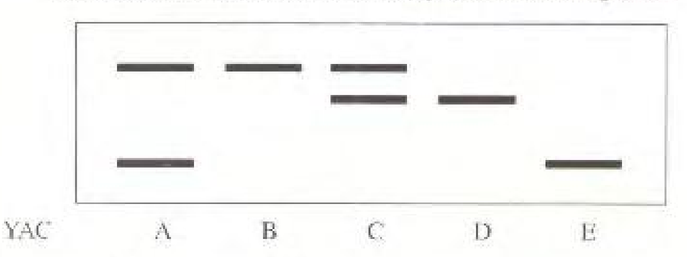
a. La única región cromosómica ausente en todas las deleciones es la que está marcada con el número 5, de manera que posiblemente es la que contiene el gen de la DMD.

b. Los otros síntomas se deben probablemente a la deleción de otras regiones que rodean al gen de la DMD.

c. Se puede desnaturalizar el DNA (esto es, separar sus cadenas) de todos los individuos con deleciones del gen de la DMD y unirlo a algún tipo de filtro. El DNA normal se corta con ultrasonidos o mediante tratamiento con enzimas de restricción, se desnaturaliza y se pasa a través del filtro que contiene el DNA delecionado. La mayor parte del DNA se unirá al filtro, pero el de la región 5 pasará a través de él. Este proceso se puede repetir varias veces. El DNA filtrado se clona y se utiliza en un análisis FISH para ver si se une a los cromosomas X delecionados de los pacientes. Si no lo hace, es un buen candidato a contener la secuencia del gen de la DMD.

PROBLEMAS

1. Mediante experimentos de hibridación *in situ*, hemos llegado a la conclusión de que cinco YAC distintos contienen fragmentos genómicos correspondientes a una banda cromosómica concreta del genoma humano. El DNA genómico se digirió con una enzima de restricción de corte infrecuente, se separó en un gel y se transfirió a una membrana que se hibridó con los YAC marcados rediactivamente. Se obtuvo el siguiente autorradiograma:



   a. Utilice estos resultados para ordenar los tres fragmentos de restricción reconocidos en la hibridación.

   b. Muestre las posiciones de los YAC en relación a los tres fragmentos de restricción genómicos del apartado a.

El problema paso a paso

1. Explique dos tipos de hibridación empleados en el análisis genético. ¿Qué clase de hibridaciones se utilizan en este problema y cuál es la base molecular de dichas hibridaciones? (Dibuje un esquema de lo que ocurre durante la hibridación a nivel molecular.)

2. En general, ¿cómo se llevan a cabo las hibridaciones *in situ*? ¿Cómo se habrán realizado las hibridaciones *in situ* concretas de este problema (como en la primera respuesta)?

3. ¿Qué es un YAC?

4. ¿Qué son las bandas cromosómicas y qué procedimiento se emplea para generarlas? Dibuje un cromosoma con algunas bandas y muestre cómo se vería una hibridación *in situ*.

5. ¿Cómo se puede explicar que cinco YAC distintos hibriden con la misma banda?

6. ¿Qué es un fragmento genómico? ¿Esperaría que los cinco YAC contuvieran el mismo fragmento genómico o fragmentos distintos? ¿Cómo cree que se generaron estos fragmentos genómicos (Indique algunos procedimientos generales para fragmentar el DNA)? ¿Tiene importancia cómo se generaron los fragmentos de DNA?

7. ¿Qué es una enzima de restricción?

8. ¿Qué es una enzima de restricción de corte infrecuente? Si no lo sabe, ¿Qué cree que podría ser? ¿Piensa que tiene algún sentido en relación con esta parte del problema? Si no, consulte en este capítulo la información sobre las enzimas de corte infrecuente.

9. ¿Por qué se marcaron los YAC radiactivamente? (¿Qué significa marcar algo radiactivamente?).

10. ¿Qué es un autorradiograma?

11. Escriba una frase que utilice las palabras *DNA*, *digestión*, *enzima de restricción*, *transferencia a filtro* y *autorradiograma*.

12. Explique cómo se obtuvo exactamente el patrón de bandas oscuras mostrado en el problema.

13. Aproximadamente, ¿cuántas kilobases de DNA hay en un genoma humano?

14. Si el DNA genómico humano se digiriera con una enzima de restricción, ¿cuántos fragmentos, aproximadamente, se producirían? ¿Decenas? ¿Cientos? ¿Miles? ¿Decenas de miles? ¿Centenares de miles?

15. ¿Serían todos estos fragmentos de DNA distintos? ¿Lo serían la mayoría?

16. Si se separaran estos fragmentos en un gel de electroforesis, ¿qué vería al añadir al gel un colorante de DNA?

17. ¿Resulta comparable su respuesta al apartado 16 con el número de bandas observables en el autorradiograma del enunciado?

18. La parte a del problema menciona «tres fragmentos de restricción». Señálelos en el diagrama.

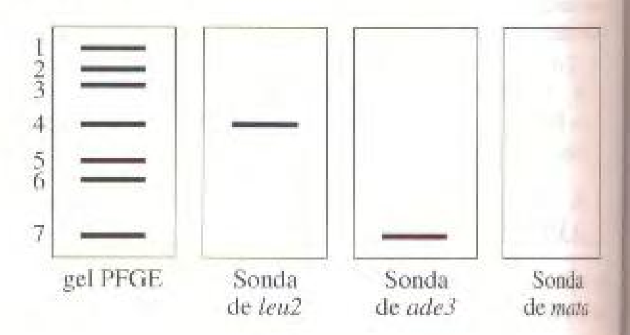
19. ¿Habrá realmente algún fragmento de restricción en el autorradiograma?

20. ¿Qué YAC hibridan con un fragmento de restricción y cuáles con dos?

21. ¿Cómo es posible que un YAC hibride con dos fragmentos de DNA? Sugiera dos explicaciones y decida cuál de ellas encaja mejor en este problema. El hecho de que todos los YAC de este problema se unan a la misma banda cromosómica (y, aparentemente, a ninguna más), ¿le ayuda a decidirse? ¿Podría un YAC hibridar con más de dos fragmentos?

22. Distinga entre el uso de la palabra *banda* en Citogenética (relacionada con la microscopia de los cromosomas) y el que tiene en Genética molecular. ¿De qué forma se relacionan los dos usos en este problema?

2. Se han clonado tres genes de levadura *leu2*, *ade3* y *mata*. Un genetista de *Neurospora* desea averiguar si este hongo también posee los tres genes y, si es así, clonarlos. Como primer paso de este análisis, hibrida los clones de levadura marcados radiactivamente con preparaciones PFGE de los cromosomas de *Neurospora*, con el resultado que se indica en el esquema adjunto. ¿Qué genes están presentes en *Neurospora* y en qué cromosomas están situados?



3. Un genetista de *Neurospora* desea clonar el gen *cys-1* que, al parecer, está situado cerca del centrómero del cromosoma 5. Dispone de dos marcadores de RFLP (RFLP 1 y RFLP 2) en esa región, así que realiza el cruzamiento siguiente:

Oak Ridge *cys-1* × Mauriceville *cys-1*$^{+}$

A continuación, analiza 100 ascosporas respecto de los genotipos RFLP y *cys-1*, obteniendo los resultados siguientes:

RFLP 1	O	M	O	M	O	M
RFLP 2	O	M	M	O	M	O
locus *cys*	*cys*	+	+	*cys*	*cys*	+
Total del genotipo	40	43	2	3	7	5

a. ¿Está *cys-1* en esta región del cromosoma?

b. Si es así, dibuje un mapa de los loci en esta región, indicando las unidades de mapa.

c. ¿Cuál sería el siguiente paso apropiado para la clonación del gen *cys-1*?

4. Cierto hongo había sido sometido a un análisis genético exhaustivo, incluyendo su cartografía genética, que permitió definir la existencia de cuatro grupos de complementación, indicativo de la presencia de cuatro cromosomas. Éstos, sin embargo, resultaron ser demasiado pequeños para observarlos al microscopio, así que no se podía saber si realmente había cuatro cromosomas. La aparición de la técnica PFGE demostró que había cuatro cromosomas. No obstante, quedaba por asignar cada grupo de ligamiento a un cromosoma concreto. Para empezar ese proceso, se utilizó el gen clonado *P* en un análisis Southern realizado con una preparación PFGE del silvestre y de dos translocaciones que, de acuerdo con estudios genéticos, implicaban en un caso a los grupos de ligamiento 1 y 4, y en el otro a los grupos de ligamiento 2 y 4. Se obtuvo el siguiente resultado:

Gel	Southern	Gel	Southern	Gel	Southern
+	Sonda *P*	Translocación 1;4	Sonda *P*	Translocación 2;4	Sonda *P*

a. A partir de estos datos, determine en cuál de los cuatro cromosomas reales (bandas) está el gen.

b. Determine qué cromosoma (banda) corresponde a cada grupo de ligamiento.

5. Se utiliza un gen clonado de *Arabidopsis* como sonda radiactiva sobre muestras de DNA de col (de la misma familia de plantas) digeridas con tres enzimas de restricción distintas. Con la enzima 1 aparecieron tres bandas radiactivas en el autorradiograma; con la enzima 2 sólo una banda, y dos bandas con la enzima 3. ¿Cómo explicaría estos resultados?

6. Se analizaron cinco clones YAC humanos (YAC-A a YAC-E) respecto de la presencia de siete sitios marcados por su secuencia (STS 1 a STS 7). Los resultados se muestran en la tabla adjunta, en la que el signo más indica la presencia de un STS en el YAC.

	STS						
YAC	1	2	3	4	5	6	7
A	+	–	+	+	–	–	–
B	+	–	–	–	+	–	–
C	–	–	+	+	–	–	+
D	–	+	–	–	+	+	–
E	–	–	+	–	–	–	+

a. Dibuje un mapa físico que muestre el orden de los STS.

b. Alinee los YAC en un *contig*.

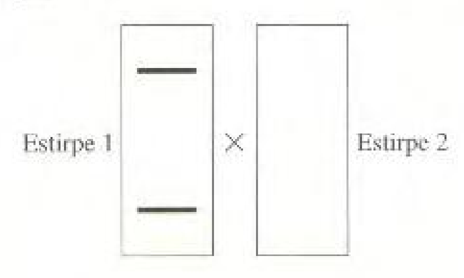
7. Se han obtenido siete híbridos celulares hombre-ratón irradiados y se han analizado respecto a la presencia de seis marcadores moleculares humanos distintos (A a F). Los resultados se muestran en la tabla adjunta, donde el signo más indica la presencia de un marcador.

	Híbridos irradiados						
Marcadores	1	2	3	4	5	6	7
A	–	+	–	–	+	+	–
B	+	–	+	–	–	–	–
C	+	–	+	+	–	+	–
D	–	+	–	+	+	+	–
E	+	–	–	+	+	–	+
F	+	–	–	+	+	–	+

a. ¿Qué ligamientos entre marcadores sugieren estos resultados?

b. ¿Hay indicios de que algunos marcadores se encuentren en cromosomas separados?

8. Un cebador de RAPD amplifica dos bandas en la estirpe haploide 1 de *Aspergillus nidulans* y ninguna banda en la estirpe 2 (que fue aislada en un país distinto). Se cruzaron ambas estirpes, analizándose siete descendientes con el resultado siguiente:



Descendencia

1 2 3 4 5 6 7

a. Dibuje esquemas que expliquen la diferencia entre los parentales.

b. Explique el origen de los descendientes y su frecuencia relativa.

c. Dibuje un ejemplo de una única tétrada de este cruzamiento, mostrando las bandas del RAPD.

9. El esquema adjunto corresponde a un *contig* de una región del cromosoma 2 de *Caenorhabditis*, en el que las letras A a H indican diferentes cósmidos:

Cromosoma 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Cósmidos A B C D E F G H

a. El gen clonado *pBR322-x* hibrida con los cósmidos C, D y E. ¿Cuál es la posición aproximada de este gen *x* en el cromosoma?

b. El gen clonado *pUC18-y* hibrida sólo con los cósmidos E y F. ¿Cuál es su posición?

c. Explique con claridad cómo es posible que ambas sondas hibriden con el cósmido E.

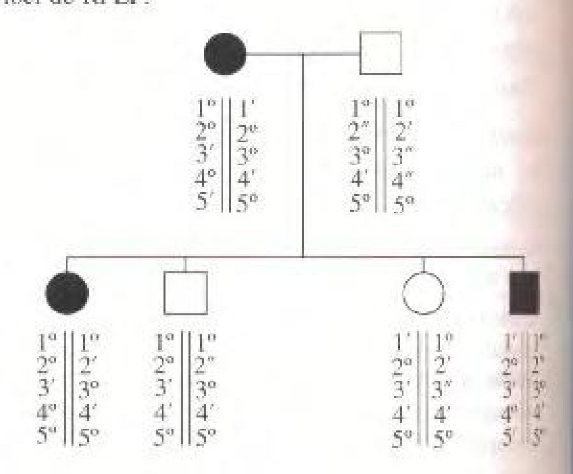
10. La herencia de cierta enfermedad se debe al alelo autosómico dominante *N*. Se observó que algunos pacientes llevaban translocaciones recíprocas en las que uno de los cromosomas implicados era siempre el cromosoma 3, y el punto de ruptura siempre estaba situado en la banda 3q3.1. Se conocen cuatro sondas moleculares que hibridan *in situ* con dicha banda, pero se desconoce en qué orden están. En las translocaciones, sólo la sonda c hibrida con el cromosoma 3 que lleva parte de otro cromosoma, y las sondas a, b y d siempre hibridan con el fragmento translocado del cromosoma 3.

a. Dibuje esquemas que ilustren el significado de estos hallazgos.

b. ¿Cómo utilizaría esta información en la clonación posicional del alelo normal *n*?

c. Una vez se ha clonado *n*, ¿cómo emplearía este clon para investigar la naturaleza de las mutaciones presentes en los pacientes de la enfermedad que carecen de translocaciones?

11. Se cree que el gen responsable de la enfermedad autosómica dominante que aparece en el pedigrí adjunto está en el cromosoma 4. Se han analizado, en todos los miembros de la familia, cinco RFLP (1-5) localizados en dicho cromosoma. Los resultados se muestran en el esquema adjunto; los superíndices representan los diferentes alelos de los loci de RFLP.



a. Explique cómo se realizó este experimento.

b. Indique cuál de los loci de RFLP está más cerca del gen de la enfermedad (explique su lógica).

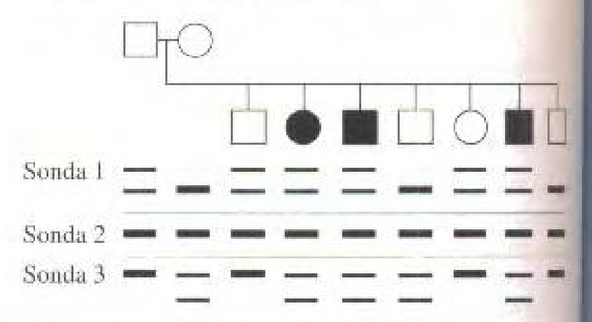
c. ¿Cómo emplearía esta información para clonar el gen?

12. Una pareja tiene tres hijos afectados de fibrosis quística (CF). Su hijo mayor acaba de casarse con una prima segunda. Se lleva a cabo un análisis molecular para determinar la probabilidad de que el nuevo matrimonio tenga hijos afectados de CF. Se utilizan tres RFLP estrechamente ligados al gen *CF* para establecer los genotipos de esta familia (esquema adjunto). Responda a las preguntas siguientes, explicando su razonamiento.

a. El hijo mayor, ¿es un homocigoto normal o un portador?

b. ¿Son sus tres hermanos homocigotos normales o portadores?

c. ¿De qué parental heredó el alelo de la enfermedad cada uno de los hijos portadores?



(Problema 12 por cortesía de Tamera Western.)

15

MUTACIONES GÉNICAS



Fenotipo producido por una mutación inestable en *Zinnia*. La mutación elimina el pigmento rojo, dando lugar a tejido blanco. Durante el desarrollo, sin embargo, la mutación revierte frecuentemente al alelo normal, lo cual permite la síntesis del pigmento rojo. Las rayas se producen porque, en los pétalos, la división celular tiene lugar principalmente a lo largo del eje longitudinal, de manera que las células que descienden de las revertientes tienden a disponerse longitudinalmente. *(De M. A. L. Smith, Department of Horticulture, University of Wisconsin; Journal of Heredity 80, 1989.)*

Ideas fundamentales

Mutación es el proceso por el que los genes cambian de una forma alélica a otra.

Las mutaciones directas suponen variaciones respecto del alelo silvestre y las reversiones son cambios que transforman un alelo mutante en el alelo silvestre.

Las mutaciones pueden provocar la pérdida de función de un gen o la aparición de una función nueva.

Las mutaciones en la línea germinal pueden transmitirse a la descendencia, pero las mutaciones somáticas no.

Hay sistemas selectivos que facilitan la obtención de mutaciones.

Los mutágenos son agentes que provocan un aumento en la tasa de mutación, que normalmente es baja.

Las mutaciones ocurren al azar, en cualquier momento y en cualquier célula de un organismo.

Cualquier proceso biológico puede analizarse genéticamente si pueden obtenerse mutaciones que alteran dicho proceso. Cada gen identificado por mutación revela un componente concreto del proceso.

El análisis genético no sería posible si careciésemos de variantes, es decir, de individuos que difieren en un carácter particular. Hemos considerado muchos ejemplos de análisis realizados en individuos con fenotipos diferentes respecto de determinados caracteres. Ahora vamos a tratar el origen de tales variantes. ¿Cómo surgen, en realidad, las variantes genéticas?

La respuesta sencilla a esa pregunta es que los organismos tienen una tendencia inherente a sufrir un cambio de un estado hereditario a otro. Tal cambio hereditario se denomina **mutación**. Los genetistas reconocen dos niveles distintos en los que pueden ocurrir las mutaciones. En el caso de una **mutación génica**, un alelo de un gen cambia y se convierte en un alelo distinto. Como el cambio ocurre dentro de un gen y puede cartografiarse en un locus («punto») cromosómico, una mutación génica se denomina a veces **mutación puntual**. En el otro nivel de cambio hereditario —**mutación cromosómica**— se ven afectados segmentos de cromosomas, cromosomas enteros, o incluso dotaciones cromosómicas completas. Estos cambios no van acompañados necesariamente de mutaciones génicas; los efectos de las mutaciones cromosómicas se deben más frecuentemente a la nueva disposición de los cromosomas y de los genes que contienen. No obstante, algunas mutaciones cromosómicas, en particular aquéllas que derivan de roturas de los cromosomas, van acompañadas de mutaciones génicas, debidas a la interrupción que se produce en los puntos de ruptura. En este capítulo, estudiaremos las mutaciones génicas; en los Capítulos 17 y 18 nos dedicaremos a las mutaciones cromosómicas.

Para estudiar cualquier cambio, se requiere un punto de referencia fijo, o estándar. En Genética, el **tipo estándar** está representado por el denominado tipo silvestre. Recuerde que el alelo silvestre puede corresponder a una forma hallada en la naturaleza o a una forma usada frecuentemente en el laboratorio. Cualquier cambio que provoque una variación respecto del alelo silvestre se conoce como **mutación directa**, o simplemente mutación; cualquier cambio que vuelve a transformar un alelo mutante en el alelo silvestre se denomina **reversión**. Por ejemplo,

$$\left.\begin{array}{l} a^{+} \longrightarrow a \\ D^{+} \longrightarrow D \end{array}\right\} \text{Mutación directa}$$

$$\left.\begin{array}{l} a \longrightarrow a^{+} \\ D \longrightarrow D^{+} \end{array}\right\} \text{Reversión}$$

El alelo no silvestre de un gen se denomina a veces una *mutación*. Aunque se use la misma palabra para designar el proceso

CUADRO 15-1. Mutaciones génicas al nivel molecular

Tipo de mutación	Resultado y ejemplo(s)
Mutaciones directas	
Cambios en un único par de nucleótidos (par de bases)	
En el DNA	
Transición	Purina sustituida por otra purina diferente; pirimidina sustituida por otra pirimidina diferente: AT → GC GC → AT CG → TA TA → CG
Transversión	Purina sustituida por una pirimidina; pirimidina sustituida por una purina: AT → CG AT → TA GC → TA GC → CG TA → GC TA → AT CG → AT CG → GC
En la proteína	
Mutación silenciosa	Codón que determina el mismo aminoácido: AGG ⟶ CGG (Ambos determinan Arg)
Mutación sinónima	Codón que determina un aminoácido distinto pero funcionalmente equivalente: AAA ⟶ AGA (Cambio de Lys básica por Arg básica (en muchos casos, no se alteraría la función proteica))
Mutación de cambio de sentido	Codón que determina un aminoácido distinto y no funcional.
Mutación sin sentido	Codón de terminación de la traducción: CAG ⟶ UAG (Cambio de un codón para Gln por uno de terminación)
Adición o deleción de un único par de nucleótidos: mutación de cambio de fase; Adición o deleción de varios a muchos pares de nucleótidos	Cualquier adición o deleción de pares de bases que no sea múltiplo de 3 cambia la fase de lectura en tramos de DNA que determinan proteína; como resultado, a partir de ese punto la secuencia de aminoácidos es distinta y, con frecuencia, se ve interrumpida por un codón de terminación.
Reversiones	
Reversión exacta	AAA (Lys) Silvestre —mutación→ GAA (Glu) Mutante —reversión→ AAA (Lys) Silvestre

su producto, y ello pueda parecer confuso al principio, en la práctica hay poca posibilidad de confusión. Así, podemos hablar de una mutación dominante (como *D* en el ejemplo de arriba) o recesiva (como *a*). Tenga presente la arbitrariedad de estos estados génicos; el silvestre de hoy pudo haber sido una mutación en el pasado evolutivo, y viceversa.

Otro término útil es el de **mutante**. Éste es, estrictamente hablando, un adjetivo y debería seguir a un nombre. Una célula mutante o un individuo mutante es aquel cuyo cambio en fenotipo puede ser atribuido a la posesión de una mutación. A veces, el nombre se omite y, en este caso, un mutante siempre se refiere a un individuo o célula con un fenotipo indicativo de que es portador de una mutación.

Otros dos términos útiles son **suceso mutacional**, que se refiere a la ocurrencia de la mutación en sí, y **frecuencia de mutación**, la proporción de mutaciones en una población de células o individuos.

Sobre cómo afectan al fenotipo los cambios en el DNA

El término **mutación puntual** se acuñó antes de que fuéramos capaces de secuenciar el DNA y descubrir de forma rutinaria la base molecular de un suceso mutacional. Actualmente, el término mutación puntual suele aplicarse a la alteración de un solo par de bases o de un número reducido de pares de bases adyacentes. En esta sección, trataremos el efecto de tales cambios sobre el fenotipo. El Cuadro 15-1 muestra una clasificación molecular de las mutaciones puntuales, indicando los principales tipos de cambios en el DNA y sus efectos funcionales sobre las proteínas.

Existen dos tipos de cambios mutacionales puntuales al nivel del DNA: **cambios de bases** e **inserciones o deleciones de bases**. Los cambios de bases son aquellas mutaciones en las que se sustituye un par de bases por otro. Los cambios de bases pueden subdividirse a su vez en dos clases: transiciones y transversiones. Para describir estas subclases hacemos referencia a cómo la mutación altera la secuencia de una de las cadenas del DNA (en la otra cadena ocurrirá el cambio complementario). Una **transición** consiste en la sustitución de una base por otra de la misma categoría química (una purina por otra purina: A → G o G → A; una pirimidina por otra pirimidina: C → T o T → C). Una **transversión** es lo contrario: la sustitución de una base de una categoría química por una base de la otra categoría (una pirimidina por una purina: C → A, C → G, T → A, T → G; una purina por una pirimidina: A → C, A → T, G → C, G → T. Cuando se describen

CUADRO 15-1. *(Continuación)*

Tipo de mutación	Resultado y ejemplo(s)
Reversión equivalente	UCC (Ser) Silvestre —mutación→ UGG (Cys) Mutante —reversión→ AGC (Ser) Psilvestre CGC (Arg, básico) Silvestre —mutación→ CCC (Pro, no básico) Mutante —reversión→ CAC (His, básico) Pseudosilvestre
Mutaciones supresoras intragénicas	
Cambio de fase de signo opuesto en un segundo sitio del gen	(ver esquema a continuación)
Mutación de cambio de sentido en un segundo sitio	Una segunda distorsión restablece una conformación más o menos silvestre de la proteína, tras la distorsión primaria.
Mutaciones supresoras intergénicas	
Supresores de mutación sin sentido	Un gen (por ejemplo, el que determina un tRNA de la tirosina) sufre una mutación en su región anticodón que le permite reconocer y alinearse con un codón mutante sin sentido (digamos, ámbar UAG) para insertar un aminoácido (tirosina, en este caso) y permitir así que se complete la traducción.
Supresores de cambio de sentido	Se originan normalmente por cambios en el anticodón de un tRNA. En *E. coli*, uno de los supresores de cambio de sentido es un tRNA anormal que es portador de glicina pero la inserta en respuesta a codones para arginina. Aunque todos los codones silvestres para arginina se traducen erróneamente, las mutaciones observadas no son letales, debido probablemente a la baja eficacia de la sustitución anormal.
Supresores de cambio de fase	Se conocen muy pocos casos; en uno de ellos, un anticodón de cuatro nucleótidos en un tRNA «lee» un codón de cuatro letras generado por la inserción de un único par de nucleótidos.
Supresores fisiológicos	Un defecto en una ruta química es compensado por otra mutación (por ejemplo, una mutación que permite un transporte más eficaz de un compuesto que, debido a la mutación original, se produce en pequeñas cantidades).

Esquema para «Cambio de fase de signo opuesto en un segundo sitio del gen»:

```
CAT CAT CAT CAT CAT CAT
    (+)  (−)
CAT XCA TAT CAT CAT CAT
 √   ×   ×   √   √   √
```

La adición de una base altera la fase de lectura → (+)

La deleción de una base restaura la fase correcta → (−)

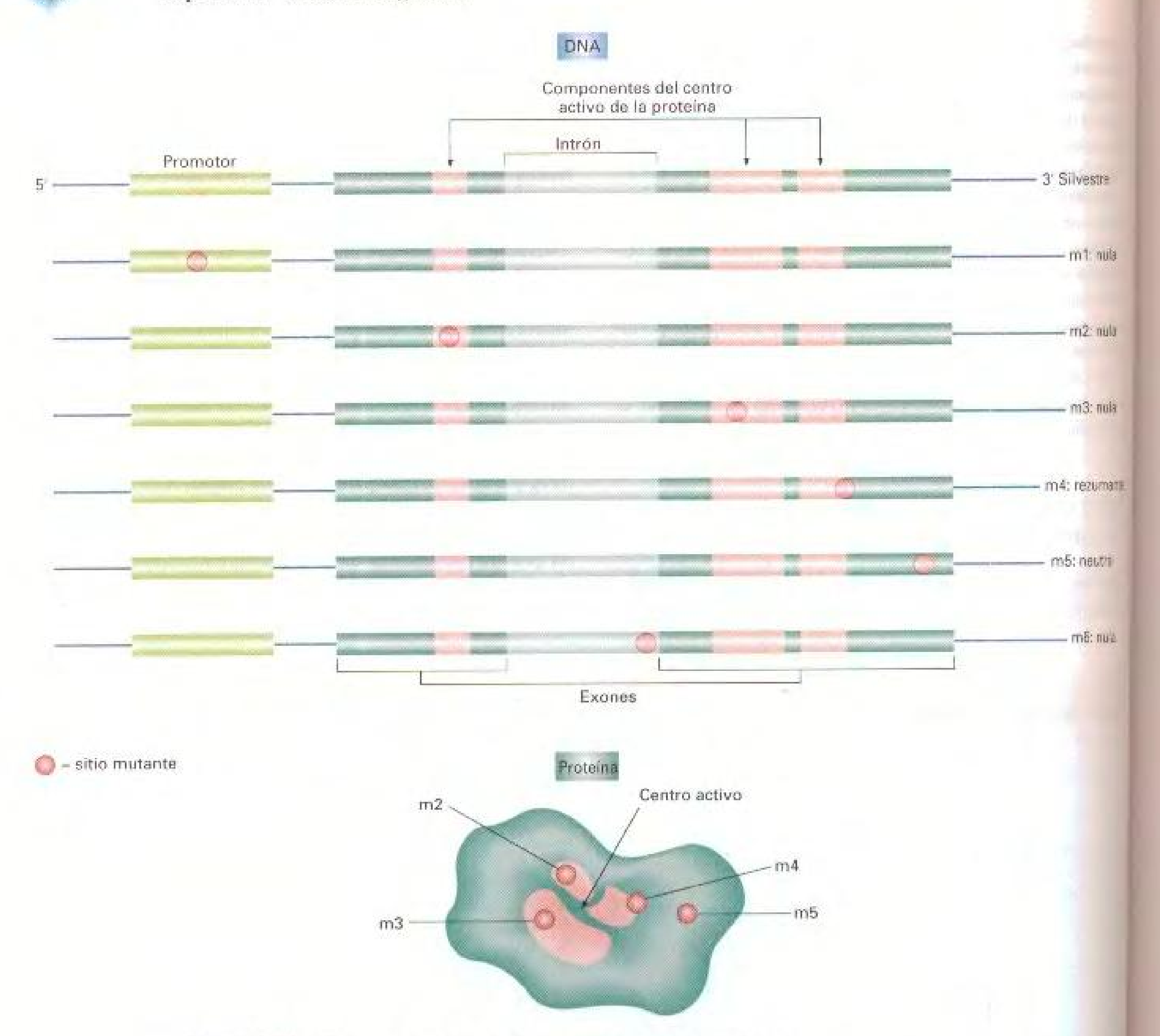


Figura 15-1. Posibles posiciones de una mutación y sus consecuencias funcionales.

estos cambios con referencia al DNA de doble cadena, deben especificarse las dos bases que forman el par: un ejemplo de transición sería GC → AT, y uno de transversión sería GC → TA.

Aunque las mutaciones por inserción o deleción afectan a pares de *nucleótidos*, por convención nos referimos a ellas como inserciones o deleciones de pares de bases. Las mutaciones más sencillas de este tipo son las inserciones o deleciones de un solo par de bases. Existen casos en los que las mutaciones surgen por la inserción o deleción simultánea de múltiples pares de bases.

¿Cuáles son las consecuencias funcionales de estos tipos diferentes de mutaciones puntuales? En primer lugar, consideremos qué es lo que ocurre cuando la mutación afecta a la parte del gen en la que está cifrada la proteína. Para el caso de los cambios de una base, hay varios resultados posibles, como consecuencia directa de dos propiedades del código genético: (1) su degeneración, y (2) la existencia de codones de terminación de la traducción. Los posibles resultados son:

1. **Mutación silenciosa**. La mutación cambia un codón por otro que determina el mismo aminoácido.
2. **Mutación de cambio de sentido**. La mutación cambia un codón por otro que determina un aminoácido distinto.
3. **Mutación sin sentido**. Un codón que determina un aminoácido es sustituido por un codón de terminación de la traducción (stop).

Las mutaciones silenciosas no cambian la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica. La gravedad de las mutaciones de cambio de sentido y de las mutaciones sin sentido variará de un caso a otro. Por ejemplo, si una mutación de cambio de sentido provoca la sustitución de un aminoácido por otro

micamente similar (**sustitución sinónima**), es probable que tal alteración no tenga un efecto drástico sobre la estructura y función de la proteína. Alternativamente, es más probable que las sustituciones de un aminoácido por otro químicamente diferente (**sustituciones no sinónimas**) supongan cambios importantes en la estructura y función proteicas. Los efectos de mutaciones de cambio de sentido en varias regiones de un gen se muestran en la Figura 15-1. Las mutaciones que afectan al centro activo (o a un sitio cerca de él) provocarán probablemente falta de función; tales mutaciones se denominan **mutaciones nulas**. Si las mutaciones afectan a regiones menos críticas de la proteína, su efecto será probablemente menos grave, generando con frecuencia mutantes **«rezumantes»**, o parcialmente inactivos.

Las mutaciones sin sentido conducirán a la terminación prematura de la proteína y, por ello, se espera que afecten gravemente a la función proteica. Comúnmente, a menos que ocurran muy cerca del extremo 3′ del tramo de lectura abierta, de modo que se produzca un polipéptido truncado sólo parcialmente y funcional, las mutaciones sin sentido darán lugar a proteínas completamente inactivas.

Como las mutaciones sin sentido, las inserciones o deleciones de un único par de bases afectan a la secuencia polipeptídica situada más allá del sitio de mutación. Debido a que el aparato traductor «lee» la secuencia del mRNA en grupos de tres pares de bases (codones), la inserción o deleción de un único par de bases cambiará la fase de lectura desde el sitio donde ha ocurrido la mutación hacia el extremo carboxilo de la proteína. Por ello, a este tipo de lesiones se las denomina **mutaciones de cambio** de fase. Estas mutaciones hacen que toda la secuencia aminoacídica que se traduce aguas abajo del sitio mutante sea completamente distinta de la secuencia original. Por tanto, las mutaciones de cambio de fase provocan normalmente una pérdida total de la función y estructura normales de la proteína.

La transformación de un fenotipo mutante en fenotipo silvestre puede ser debida a cambios dentro del propio gen mutado o a cambios en algún otro gen que genera un alelo supresor. En el Cuadro 15-1 se ofrecen algunos ejemplos de mutaciones supresoras.

Volvamos ahora a aquellas mutaciones que tienen lugar en secuencias reguladoras y otras secuencias no implicadas en determinar proteína. En esencia, esas regiones de un gen consisten en una serie de «dianas» en el DNA o el RNA a las que se unen una gran variedad de proteínas y moléculas de RNA, mezcladas con secuencias no esenciales. Por tanto, los efectos de las mutaciones en las partes de un gen que no determinan proteína son más difíciles de predecir.

En general, la consecuencia funcional de cualquier mutación puntual (cambio de base, inserción o deleción) en las regiones citadas depende de su localización y de si altera o no un sitio de unión de una proteína o RNA. Ejemplos de estos tipos de sitios de unión de proteínas o RNA serían los sitios donadores y aceptores del procesamiento de intrones de pre-mRNA eucarióticos, los sitios de unión de la polimerasa de RNA en los promotores y los sitios de unión del rRNA 16S (secuencias de Shine-Delgarno) situados aguas arriba de las posiciones de inicio de la traducción de los mRNA procarióticos. Las mutaciones que alteren estos sitios pueden cambiar el patrón de expresión de un gen respecto a la cantidad normal de producto producida en un momento determinado, su respuesta a determinadas situaciones ambientales, su producción en tejidos concretos, o todo ello a la vez. Más adelante, cuando exploremos los mecanismos del desarrollo, veremos muchos más ejemplos adicionales de estos sitios diana. Es importante darse cuenta de que las mutaciones reguladoras alteran la cantidad del producto génico proteico pero no la estructura de la proteína. La Figura 15-2 muestra algunos ejemplos de los efectos de diferentes tipos de mutaciones sobre el mRNA y la proteína.

Mutación somática frente a mutación germinal

Genes y cromosomas pueden sufrir mutaciones en un tejido somático o en un tejido germinal, y tales cambios se denominan, respectivamente, **mutaciones somáticas** y **mutaciones germinales**. La Figura 15-3 muestra un esquema de estos dos tipos de mutaciones.

Mutación somática

Si ocurre una mutación en una célula concreta de un tejido somático en desarrollo, esa célula será la progenitora de una población de células mutantes idénticas, descendientes todas ellas de la célula que mutó. Una población de células idénticas derivadas por división asexual de una célula progenitora se denomina **clon**. Como las células de un clon tienden a permanecer unas junto a otras durante el desarrollo, a menudo una mutación somática tiene como resultado visible la aparición de una «mancha» de células fenotípicamente mutantes que se denomina **sector mutante**. Cuanto más pronto se produzca el suceso mutacional durante el desarrollo, más grande será el sector mutante (Fig. 15-4). Los sectores mutantes serán distinguibles a simple vista sólo si su fenotipo contrasta visualmente con el fenotipo de las células silvestres que lo rodean (Fig. 15-5).

En los diploides, se espera que una mutación dominante se manifieste fenotípicamente en la célula o clon de células que la contenga. Pero no así una mutación recesiva, ya que será enmascarada por el alelo silvestre que, por definición, es dominante sobre la mutación recesiva. Una segunda mutación podría generar la homocigosis de la mutación recesiva, pero tal hecho sería muy raro.

¿Cuáles serían las consecuencias de una mutación somática en una célula o un organismo completamente desarrollado? Si la mutación ocurre en un tejido cuyas células están todavía dividiéndose, entonces existe la posibilidad de que aparezca un clon mutante. Si la mutación ocurre en una célula «posmitótica», es decir, en una célula que no volverá a dividirse, cabe esperar entonces que su efecto sea insignificante. Incluso si fuera una mutación dominante que provocara la muerte de la célula, o un defecto celular grave, tal pérdida de función sería compensada por las células normales del tejido. No obstante, las mutaciones que provocan cáncer constituyen un caso especial. Estas mutaciones ocurren en un tipo especial de genes que se denominan **protooncogenes**, muchos de los cuales regulan la división celular. Tales

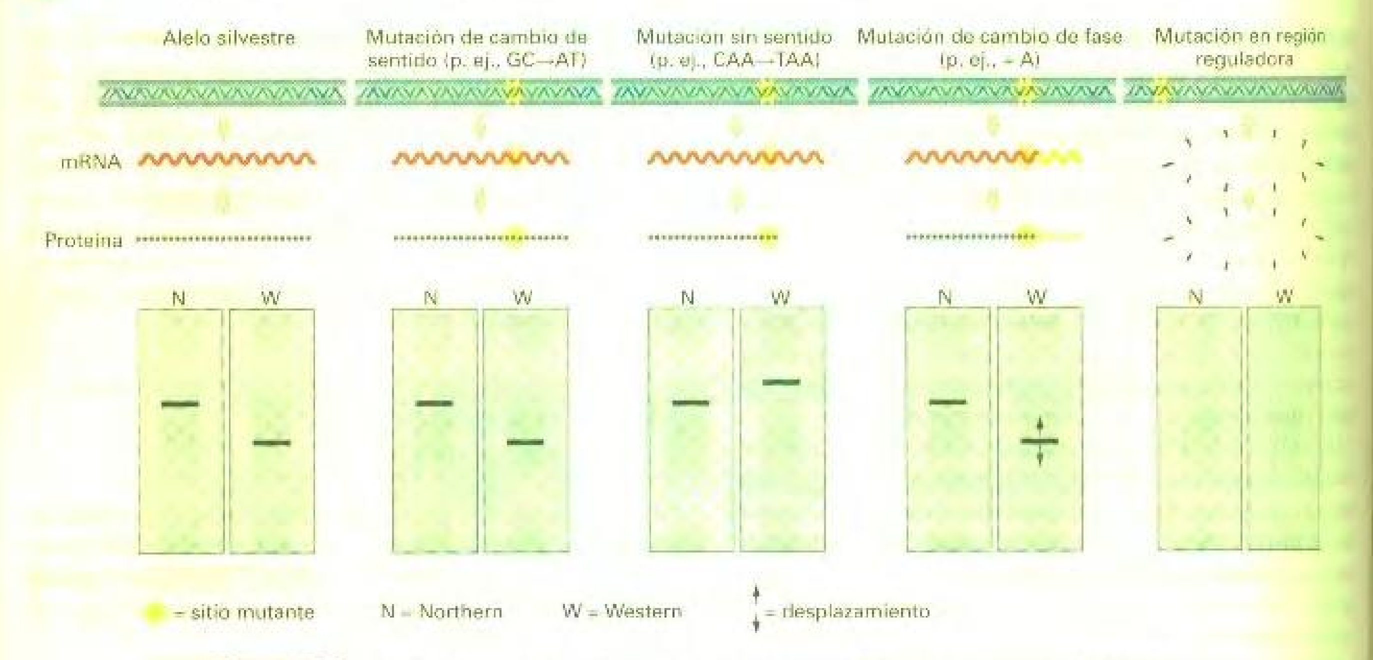


Figura 15-2. Efecto de algunos tipos frecuentes de mutaciones sobre el RNA y la proteína. Los dibujos de la parte inferior representan resultados de análisis Northern (N) y Western (W).

mutaciones hacen que la célula entre en un estado de división incontrolada, dando lugar a un grupo de células que se denomina **tumor**. Veremos algunos ejemplos más adelante, en este mismo capítulo.

¿Se pueden transmitir las mutaciones somáticas a la descendencia? No. Esto es imposible, ya que, por definición, las células somáticas no se transmiten nunca a la descendencia. Sin embargo, tenga en cuenta que si se toma un esqueje de un tallo o de una hoja que lleven el sector somático mutante, la planta que crezca a partir de ese esqueje puede desarrollar tejido germinal que proceda del sector mutante. En otras palabras, puede aparecer una rama con flores a partir del sector somático mutante. Así, aquello que apareció como una mutación somática puede ser transmitido sexualmente. Un ejemplo aparece en la Figura 15-6.



Figura 15-4. Una mutación temprana produce mayor proporción de células mutantes en la población en crecimiento que una mutación más tardía.

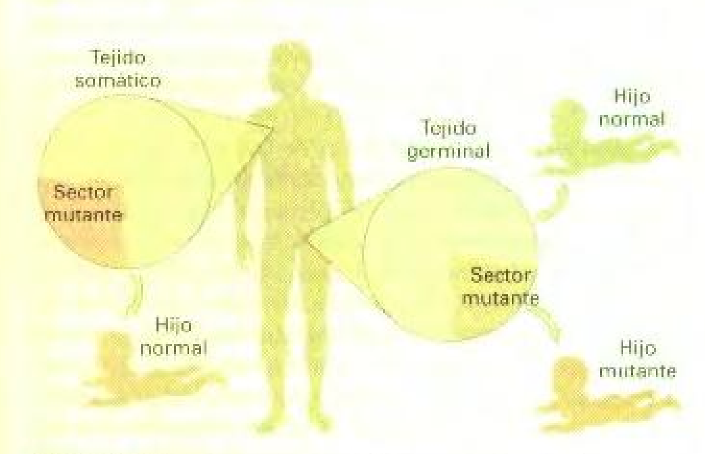


Figura 15-3. Las mutaciones somáticas no se transmiten a los descendientes, mientras que las mutaciones germinales sí pueden transmitirse a algunos de ellos.



Figura 15-5. Mutación somática en la manzana Deliciosa roja. El alelo mutante, que determina color dorado, apareció en la pared del ovario floral que finalmente se desarrolló como parte carnosa de la manzana. Las semillas no son mutantes y producirían árboles de manzanas rojas. (Adviértase que, de hecho, la manzana Deliciosa dorada apareció por primera vez como una rama mutante de un árbol de la variedad roja). (Anthony Griffiths)



Figura 15-6. Una mutación que genera pétalos blancos apareció originalmente en el tejido somático, pero acabó formando parte del tejido germinal y siendo trasmitida a través de semillas. La mutación ocurrió en el primordio de una rama lateral del rosal. La rama creció y, en su momento, produjo flores. (De Harper Horticultural Slide Library).

Cualquier método para detectar mutaciones somáticas debe permitir descartar que el sector se deba a segregación o recombinación mitótica (Cap. 6). Si el individuo es diploide homocigótico, la aparición de manchas somáticas se debe, casi con toda seguridad, a mutación.

Mutación germinal

Una *mutación germinal* es la que ocurre en la línea germinal, un tejido especializado que es apartado durante el curso del desarrollo para formar las células sexuales. Si una célula mutante participa en la fecundación, la mutación pasará a la generación siguiente. Un individuo de fenotipo perfectamente normal y de antecesores también normales puede ser portador de células sexuales mutantes no detectadas. Estas mutaciones sólo se detectarán si se incorporan a un cigoto (Figuras 15-7 y 15-8). Recuerde del Capítulo 2 que se cree que la mutación, ligada al cromosoma X, de la hemofilia detectada en varias familias reales europeas se produjo en las células germinales de la Reina Victoria o de uno de sus padres. La mutación empezó a expresarse sólo en sus hijos varones.

La detección por métodos experimentales de mutaciones germinales depende de que puedan descartarse la segregación y la recombinación meióticas como posibles causas de diferencias fenotípicas entre progenitores y descendientes.

COROLARIO

Antes de atribuir cualquier nuevo fenotipo heredable a un suceso mutacional, debe descartarse la posibilidad de que sea debido a segregación o recombinación. Esto es aplicable tanto a las mutaciones somáticas como a las germinales.

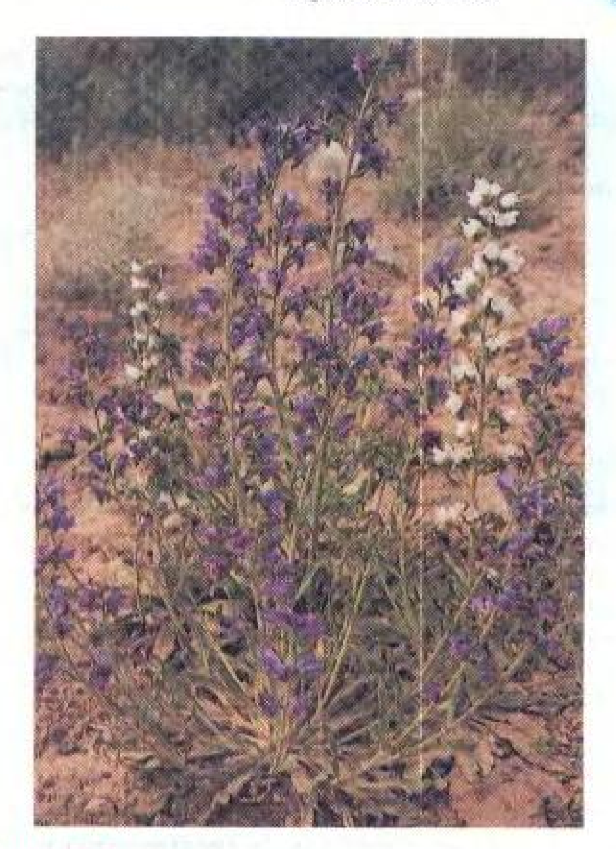


Figura 15-7. Mutación germinal que genera pétalos blancos en *Echium vulgare*. Se produjo una mutación germinal recesiva *a* en una planta azul *A/A* de la generación anterior, convirtiéndose el tejido germinal en *A/a*. Tras autofecundación, la mutación se transmitió a los descendientes, algunos de los cuales eran *a/a* y manifestaron el fenotipo mutante. (Anthony Griffiths.)



Figura 15-8. Una mutación que produce orejas curvadas se produjo en la línea germinal de un gato normal de orejas rectas, y se expresó en los descendientes, como el gato de esta fotografía. Esta mutación apareció en una población de Lakewood, California, en 1981, y es autosómica dominante. (De R. Robinson, *Journal of Heredity* 80, 1989, 474.)

Tipos de mutantes

Las consecuencias fenotípicas de una mutación pueden ser tan sutiles que sea necesario aplicar técnicas bioquímicas muy finas para detectar una diferencia respecto del fenotipo debido al alelo silvestre. Alternativamente, la mutación puede ser tan grave que provoque defectos morfológicos importantes e incluso la muerte. A continuación, presentamos una clasificación burda, basada

únicamente en cómo se reconocen las mutaciones, y que de ningún modo pretende ser completa. Además, los diferentes modos de clasificar las mutaciones son, a menudo, solapantes.

Mutaciones morfológicas

Morfo significa «forma». Las mutaciones morfológicas afectan a las propiedades externamente visibles de un organismo, como la forma, el color o el tamaño. Las ascosporas albinas en *Neurospora*, las alas curvadas en *Drosophila* y el enanismo en guisante son todas ellas mutaciones morfológicas. En la Figura 15-9 aparecen ejemplos adicionales de mutantes morfológicos.

Mutaciones letales

Un nuevo alelo mutante letal se reconoce por sus efectos sobre la supervivencia del organismo. A veces, la causa primaria de la muerte es fácil de identificar (por ejemplo, en el caso de ciertas anormalidades de la sangre). Pero generalmente, la causa de la muerte permanece oculta y el alelo mutante sólo se reconoce por sus efectos sobre la viabilidad. Un ejemplo de mutación letal aparece en la Figura 15-10.

Mutaciones condicionales

En esta clase, un alelo mutante provoca un fenotipo mutante sólo en determinadas condiciones, llamadas **condiciones restrictivas**, pero en otras circunstancias, denominadas **condiciones permisivas**, determina un fenotipo normal. Los genetistas han estudiado muchos mutantes sensibles a la temperatura. En *Drosophila*, por ejemplo, se conocen ciertas mutaciones denominadas letales dominantes sensibles al calor (termosensibles). Los heterocigotos (digamos H^+/H) son normales a 20 °C (condición permisiva), pero se mueren si se eleva la temperatura a 30 °C (condición restrictiva).

Muchos organismos mutantes son menos vigorosos que sus formas normales respectivas y, por tanto, más problemáticos como sujetos de experimentación. Por este motivo, los mutantes condicionales son muy útiles, ya que pueden cultivarse en condiciones permisivas y trasladarlos luego a las condiciones restrictivas para su estudio. Otra ventaja de las mutaciones condicionales es que permiten el establecimiento del período sensible del desarrollo, el período específico de acción del gen. En estos estudios, organismos portadores de alguna mutación condicional concreta se cambian de condiciones permisivas a restrictivas en diferentes momentos del desarrollo. Algunos cambios provocarán la aparición del carácter mutante, y otros la del carácter silvestre, sirviendo estos resultados para estimar el período de acción del gen.

Mutaciones bioquímicas

Los cultivos microbianos resultan convenientes para el estudio de mutaciones bioquímicas, identificadas por la pérdida o el

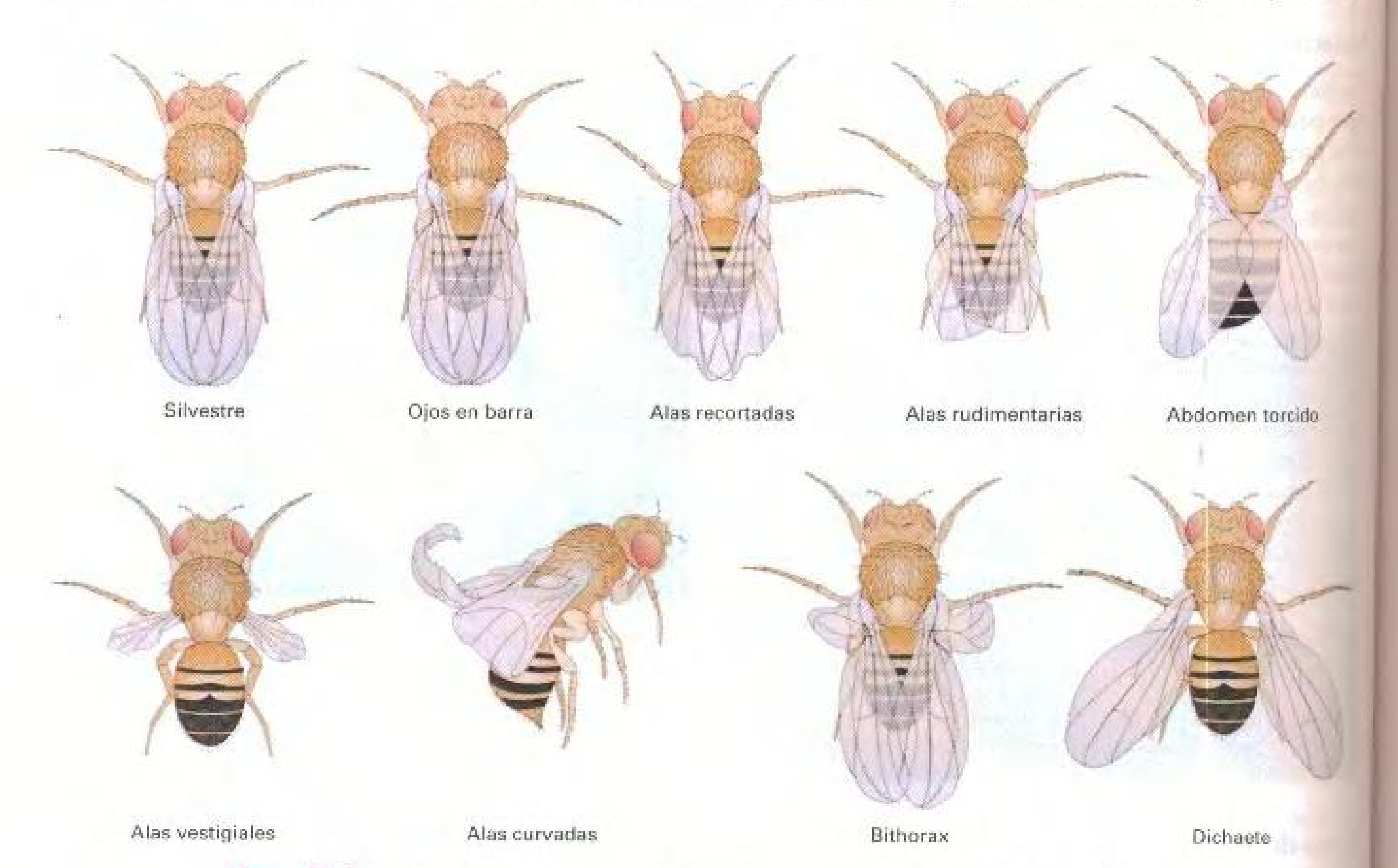


Figura 15-9. Ocho mutaciones morfológicas de *Drosophila*, y el silvestre como referencia. La mayoría de los fenotipos mutantes se explican solos; Bithorax es una anormalidad del tórax que da lugar a dos alas pequeñas en lugar de los halterios; la característica más notable de Dichaete es que las alas se mantienen en un ángulo de 45 grados con el cuerpo.

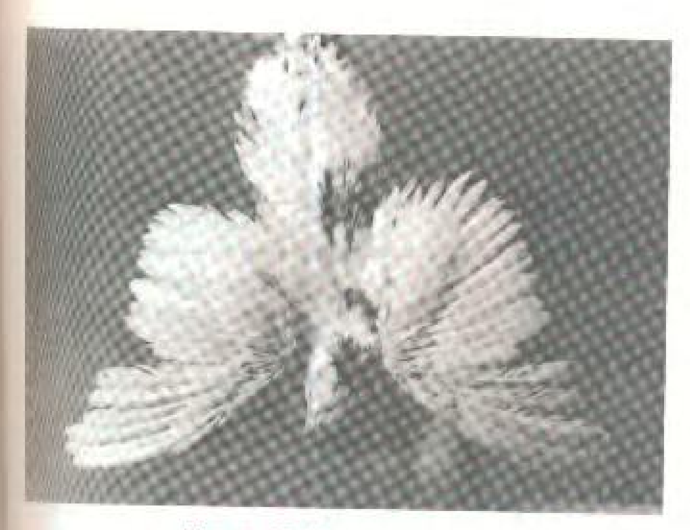




Figura 15-10. Fenotipo silvestre (izquierda) y fenotipo debido a una mutación que afecta al plumaje de la codorniz japonesa (derecha). Esta mutación surgió en una granja experimental de codornices y pudo ser mantenida como un caso interesante para su análisis genético. Sin embargo, si tal mutación hubiera surgido en la naturaleza, hubiera sido casi con certeza letal. (Janet Fulton.)

cambio de alguna función bioquímica celular. Ello conduce con frecuencia a la incapacidad para crecer y proliferar. Sin embargo, en muchos casos puede restaurarse la capacidad de crecimiento añadiendo al medio de cultivo algún nutriente específico. En general, los microorganismos son **protótrofos**: pueden subsistir en un medio compuesto por sales inorgánicas y una fuente de energía; este medio de cultivo se denomina **medio mínimo**. Por el contrario, los mutantes bioquímicos suelen ser **auxótrofos**: el medio debe ser enriquecido con ciertos nutrientes adicionales para permitir su crecimiento. Por ejemplo, una clase determinada de mutantes bioquímicos de hongos no crece a menos que se añada la base nitrogenada adenina. Las mutaciones responsables se denominan *ad*, mientras que el alelo silvestre se denomina ad^+. Los alelos mutantes *ad* provocan un fenotipo auxotrófico para adenina. La Figura 15-11 ilustra el procedimiento práctico para comprobar los fenotipos prototróficos y auxotróficos.

Aunque se utilizan cultivos microbianos para inducir experimentalmente mutaciones bioquímicas, hay que hacer notar que muchas enfermedades hereditarias se deben a mutaciones de este tipo, que afectan a algún paso de la química celular. Se ha empleado la expresión errores congénitos del metabolismo para denominar tales desordenes bioquímicos. Dos ejemplos son la fenilcetonuria y la galactosemia.

Mutaciones de pérdida de función

En general, las mutaciones de pérdida de función (nulas) son recesivas. Una célula diploide silvestre posee dos alelos silvestres de un gen, y ambos generan un producto génico normal. En

Figura 15-11. Comprobación de auxotrofía o prototrofía de cepas de *Neurospora crassa*. En este experimento, se analizan 20 descendientes de un cruzamiento entre un auxótrofo para adenina y otro para leucina. Genotípicamente, el cruzamiento es $ad \cdot leu^+ \times ad^+ \cdot leu$, y los descendientes pueden ser portadores de cualquiera de las cuatro posibles combinaciones de esos alelos. Para analizar la descendencia, el investigador intenta crecer células en placas de Petri con varios tipos de medios gelificados. Los medios son: medio mínimo (Min) con adenina (Ad, arriba a la izquierda), con leucina (Leu, arriba a la derecha), sin ninguno de los dos compuestos (abajo a la izquierda), o con ambos (abajo a la derecha). El crecimiento genera una pequeña colonia circular (blanca en la fotografía). Cualquier estirpe que crezca en medio mínimo ha de ser $ad^+ \cdot leu^+$, la que crezca con adenina y sin leucina debe ser leu^+, y la que crezca con leucina y sin adenina, ad^+. Todas ellas deben crecer en presencia de adenina y leucina; se trata de un control para comprobar su viabilidad. Como ejemplos, la cepa 8 debe ser $ad \cdot leu^+$, la 9 $ad \cdot leu$, la 10 $ad^+ \cdot leu^+$, y la 13 $ad^+ \cdot leu$. (Anthony Griffiths.)

una célula heterocigótica (el genotipo crucial para establecer la dominancia o recesividad de una mutación), el único alelo normal puede ser capaz de suministrar suficiente producto génico para dar lugar al fenotipo silvestre. En tales casos, las mutaciones de pérdida de función son recesivas. Algunas veces, la célula es capaz de incrementar el nivel de expresión del único alelo silvestre, de manera que la cantidad del producto génico normal que aparece en el heterocigoto es más de la mitad de la que aparece en el silvestre homocigótico. Sin embargo, algunas mutaciones de pérdida de función son dominantes. En tales casos, el único alelo silvestre del heterocigoto no puede suministrar la cantidad de producto génico necesaria para que la célula y el organismo sean de fenotipo silvestre. La acción de las mutaciones de pérdida de función se representa esquemáticamente en la Figura 15-12*a* y *b*.

Mutaciones de ganancia de función

Como los sucesos mutacionales introducen cambios genéticos al azar, la mayoría de las veces provocan pérdida de función. Los sucesos mutacionales serían como balas disparadas contra un complejo dispositivo mecánico; la mayoría de las veces lo estropearán. Sin embargo, es concebible que, en algunos casos raros, una bala golpee la máquina de tal manera que la haga adquirir una nueva función. Así ocurre con los sucesos mutacionales; algunas veces, el cambio aleatorio confiere por puro azar alguna nueva función al gen. La nueva función se expresará en heterocigosis y, por tanto, las mutaciones de ganancia de función actúan con frecuencia como alelos dominantes, generando algún tipo de fenotipo nuevo. La ganancia de función está representada en la Figura 15-12*c*.

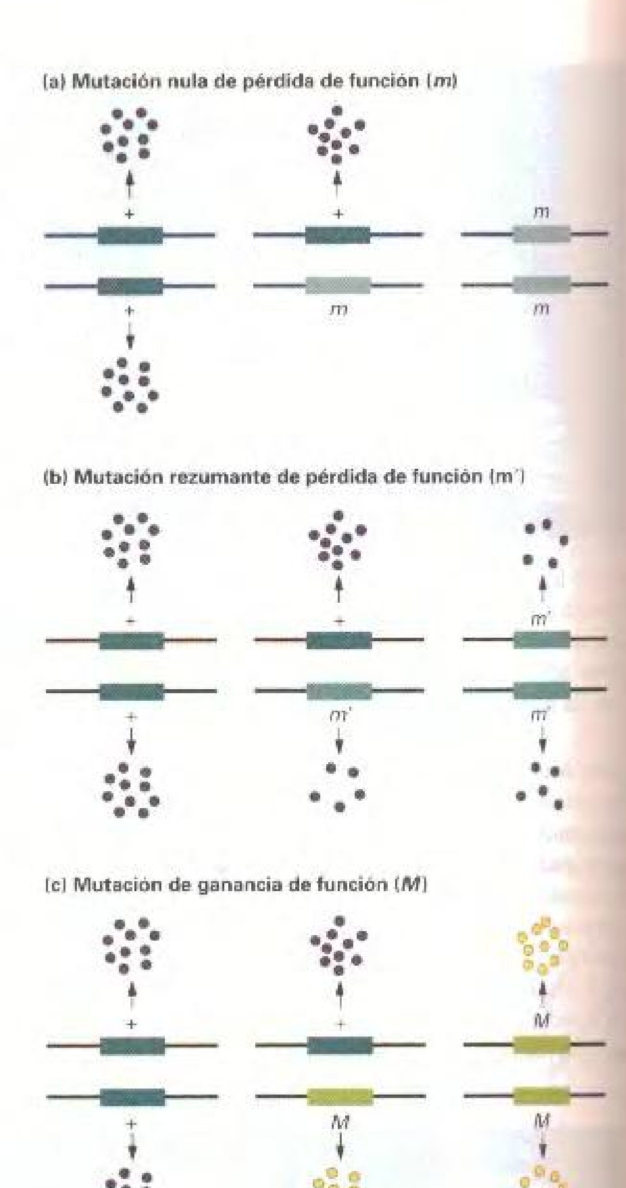


Figura 15-12. (a) La mutación *m* ha provocado una pérdida completa de función (es una mutación nula). En el heterocigoto se produce proteína silvestre, que a menudo es suficiente para que se manifieste el fenotipo silvestre, en cuyo caso *m* sería recesiva. Si el producto génico silvestre fuera insuficiente, la mutación aparecería como dominante. (b) El alelo mutante *m'* mantiene parte de su función, pero en el homocigoto no hay suficiente producto para que el fenotipo sea silvestre. (c) La mutación *M* ha provocado la aparición de una nueva función celular, representada por el producto génico de color amarillo. *M* se expresa en el heterocigoto y es probable que sea dominante. El mutante homocigótico será o no viable, dependiendo del papel del alelo +.

La ocurrencia de mutaciones

La mutación es un fenómeno biológico que ha venido ocurriendo desde el comienzo de la vida. Se trata de un proceso fascinante y digno de ser estudiado como tal. Alelos mutantes como los mencionados en los apartados anteriores tienen un valor incalculable en el estudio del propio proceso de mutación. Por ejemplo, nos permiten calcular la frecuencia de mutación. En este contexto, los alelos mutantes se emplean como marcadores genéticos, o genes representativos: su función no es especialmente importante, excepto como una vía para seguir el proceso de mutación.

En la Genética moderna, sin embargo, los genes mutantes desempeñan otro papel en el que su función concreta sí es importante. Los genes mutantes se utilizan como instrumentos para desensamblar los componentes de una función biológica y para examinar su funcionamiento y las relaciones entre ellos. Por ello, para un biólogo que estudia una función concreta es particularmente interesante contar con tantas formas mutantes afectadas en esa función como le sea posible. Esta necesidad ha llevado a la «caza de mutantes» como preludio importante de cualquier trabajo de disección genética en Biología. Identificar una variante genética equivale a identificar un componente del proceso biológico. Desarrollaremos esta idea más adelante en este mismo capítulo.

COROLARIO

Las mutaciones pueden utilizarse con dos propósitos: para estudiar el propio proceso de mutación y para diseccionar genéticamente funciones biológicas.

Sistemas para la detección de mutaciones

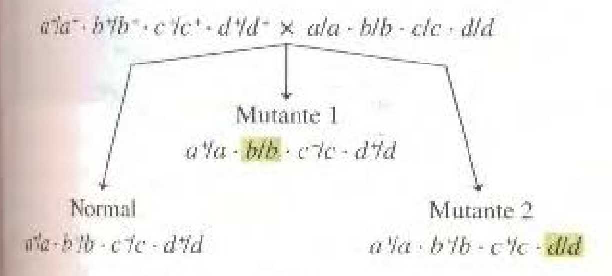
La gran estabilidad y constancia en la forma de las especies de una generación a otra sugiere que la mutación debe de ser un suceso poco frecuente. Esta suposición ha sido confirmada, creando así un problema al genetista preocupado por demostrar la existencia de mutaciones.

Una necesidad primaria es disponer de un sistema de detección —un conjunto de condiciones en las que un alelo mutante manifieste su presencia al nivel fenotípico. Un sistema de este tipo permite encontrar mutaciones raras en búsquedas a gran escala que se denominan **escrutinios** o **cribados**.

Una de las consideraciones principales a tener en cuenta aquí es la dominancia. El sistema debe diseñarse de tal manera que las mutaciones recesivas, las más comunes, no queden enmascaradas por un alelo normal dominante (las mutaciones dominantes no presentan ese problema). Como ejemplo, podemos utilizar uno de los primeros sistemas de detección diseñados, el sistema utilizado por Lewis Stadler en los años veinte para estudiar en el maíz la mutación del alelo *C*, cuya manifestación fenotípica es una semilla coloreada, a *c*, que da lugar a una semilla blanca. Aquí estamos tratando con el fenotipo del endospermo de la semilla. Si retrocede a la Figura 3-22, verá que este tejido se forma por fusión de dos núcleos femeninos haploides con un núcleo haploide de la célula de polen masculina. Por consiguiente, el tejido tiene tres dotaciones cromosómicas (es $3n$). Un solo alelo dominante *C* junto a dos alelos *c* hace que la semilla sea coloreada.

Stadler cruzó hembras *c/c* con machos *C/C* y examinó miles de semillas individuales de las mazorcas de maíz resultantes del cruzamiento. Cada semilla representa un descendiente individual. En ausencia de mutación, cada semilla sería *C/c/c* y mostraría el fenotipo coloreado. La presencia de una semilla blanca indicaría que había ocurrido una mutación de *C* a *c* en el progenitor *C/C*. El sistema habría detectado así una mutación germinal. Aunque laborioso, se trata de un método directo y seguro para detectar mutantes (Fig. 15-13).

Este sistema básico puede extenderse a tantos loci como heterocigotos puedan hacerse cómodamente en un mismo cruzamiento. Por ejemplo,



Incrementando el número de loci en estudio, el investigador aumenta la probabilidad de detectar una mutación en el experimento.

El test de Stadler para detectar mutaciones germinales se denomina ahora **test específico de locus**. La misma lógica puede aplicarse también a las mutaciones somáticas. De nuevo, para incrementar la probabilidad de encontrar las mutaciones, y poder así realizar estudios cuantitativos, se aumenta el número de loci en estudio cuanto sea posible. Veamos un ejemplo en el que

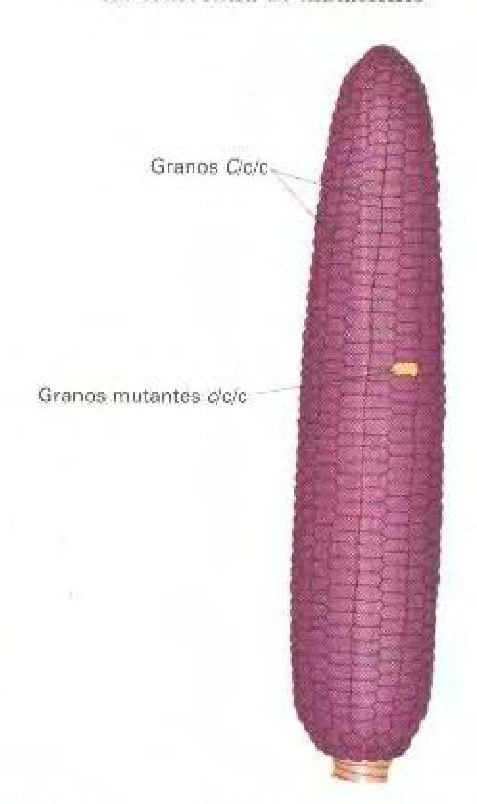


Figura 15-13. Sistema de detección de mutaciones en un locus específico del maíz. El alelo *C* determina la acumulación de un pigmento púrpura en el grano, mientras que c provoca ausencia de dicho pigmento. El genetista realiza cruzamientos ♀ *c/c* × ♂M *C/C*, y las mutaciones *C* → *c* en la línea germinal masculina se manifiestan como granos no pigmentados en las mazorcas del maíz. (**Nota:** la capa coloreada de la semilla de maíz es triploide, y está constituida por dos núcleos femeninos idénticos y un núcleo masculino.)

las mutaciones detectables afectan al color del pelaje de los ratones. Los fenotipos y sus genes responsables son: grisáceo (*ln*), pálido (*pa*), marrón (*b*), chinchilla (*ch*), rosáceo (*p*), diluido (*d*) y perla (*pe*). Se cruzan líneas puras de ratón de los siguientes genotipos:

$$ln/ln \cdot pa/pa \cdot b^+/b^+ \cdot ch^-/ch^+ \cdot p^+/p^+ \cdot d^+/d^+ \cdot pe/pe \times ln^+/ln^+ \cdot pa^+/pa^+ \cdot b/b \cdot ch/ch \cdot p/p \cdot d/d \cdot pe^+/pe^+$$

y las hembras generarán embriones del genotipo heterocigótico múltiple siguiente:

$$ln/ln^+ \cdot pa/pa^+ \cdot b/b^+ \cdot ch/ch^+ \cdot p/p^+ \cdot d/d^+ \cdot pe/pe^+$$

Como todos los alelos mutantes son recesivos, se espera que el pelaje de la F_1 sea silvestre. Sin embargo, mutaciones somáticas de silvestre a mutante en cualquiera de los loci provocarán la aparición de manchas mutantes del pelaje (Fig. 15-14). La frecuencia de esas manchas mutantes aumenta dramáticamente si el investigador inyecta en el útero de las hembras preñadas, al octavo día de gestación, un agente químico inductor de mutaciones. Esta inyección expone a los embriones en desarrollo al agente químico, y las crías muestran muchos más sectores mutantes que aquellas que no fueron expuestas al mutágeno. La potencia del compuesto químico se mide contando simplemente el número de sectores mutantes y comparándolo con el número observado en animales no tratados.

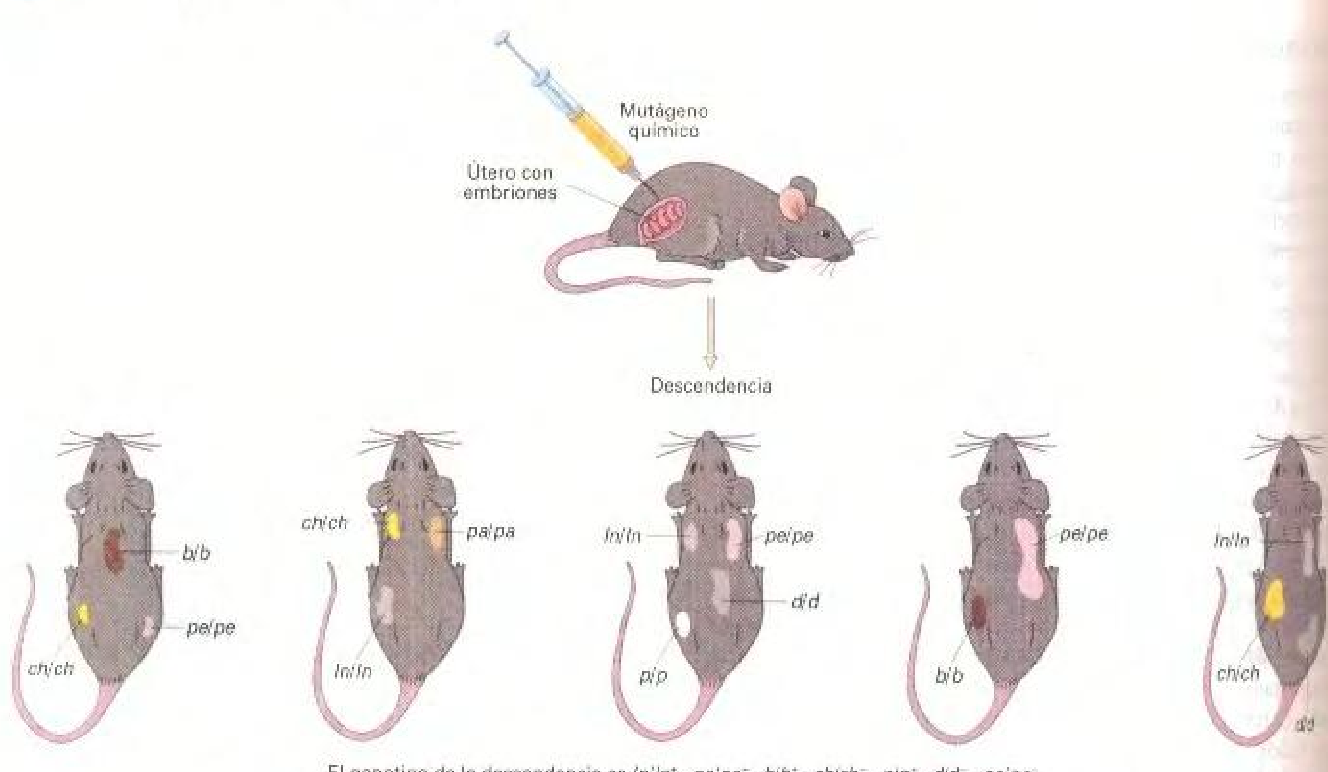
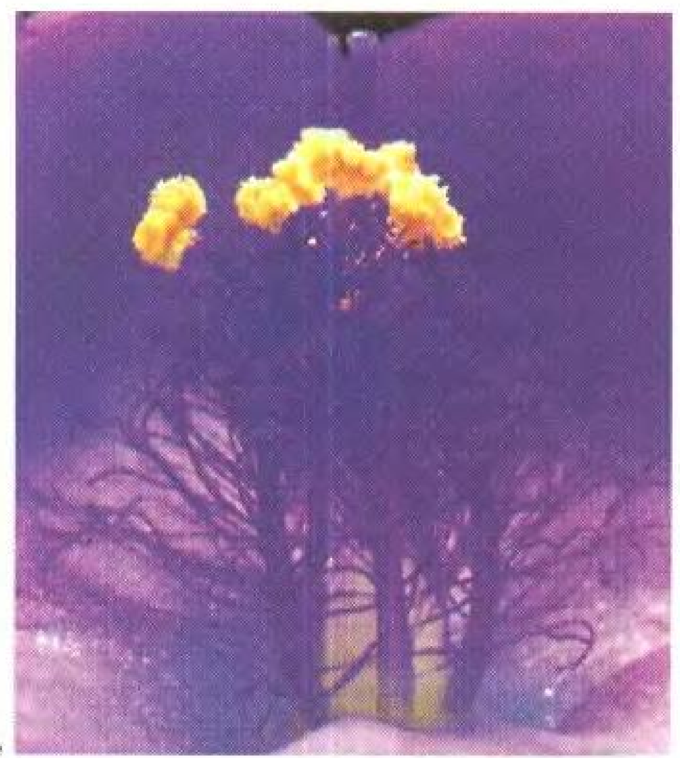


Figura 15-14. Sistema de detección de mutaciones somáticas recesivas en siete loci implicados en el color del pelaje del ratón. El cruzamiento *ln/ln, pa/pa, b^+/b^+, ch^+/ch^+, p^+/p^+, d^+/d^+, pe/pe* × *ln^+/ln^+, pa^+/pa^+, b/b, ch/ch, p/p, d/d, pe^+/pe^+* produce una descendencia heterocigótica para los siete loci y de apariencia predominantemente normal. Cualquier mutación somática en cualquiera de los loci silvestres da lugar a una mancha mutante en el pelaje de la descendencia. Los colores mutantes son: grisáceo (*ln*), pálido (*pa*), marrón (*b*), chinchilla (*ch*), rosáceo (*p*), diluido (*d*) y perla (*pe*). La frecuencia de las mutaciones puede incrementarse administrando un producto inductor de mutaciones (un mutágeno químico) a los embriones en desarrollo.



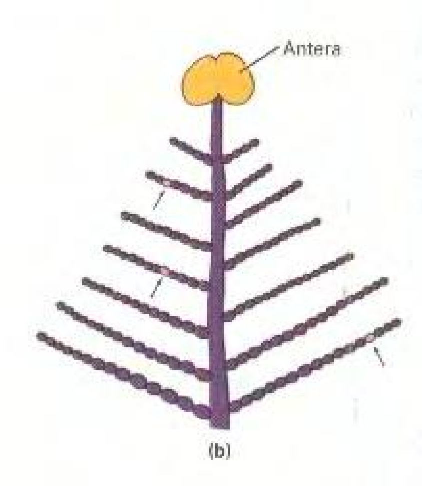


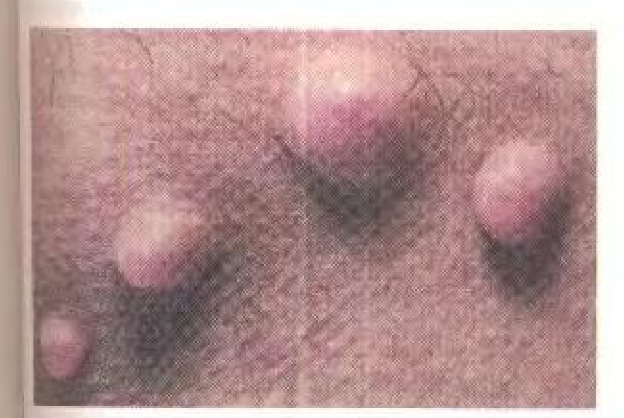
Figura 15-15. (a) Estambres de una planta de *Tradescantia* heterocigótica para los alelos *P* y *p*. (b) En las cadenas que constituyen los pelos laterales algunas de las células (señaladas con una flecha) son mutantes. El color más oscuro (pigmentación púrpura) está determinado por *P*, y el color más pálido (pigmentación rosa) por *p/p*. (Parte a, de Runk/Schoenberger/Grant Heilman.)

En la planta *Tradescantia*, se ha desarrollado un test específico de locus para mutaciones somáticas basado en el uso de un solo gen en heterocigosis. Una línea de *Tradescantia* llamada 02, que se propaga vegetativamente, es heterocigótica *P/p*. Estos alelos confieren pigmentación dominante azul y recesiva rosa. La coloración se expresa en pétalos y estambres. Los estambres de esta planta tienen unos pelos que están formados por muchas células individuales en cadena. Así pues, se pueden analizar fácilmente al microscopio millones de células en búsqueda de aquellas que sean de color rosa, que deben haberse originado por una mutación $P \rightarrow p$ que ha convertido una célula *P/p* en *p/p* (Fig. 15-15).

Los genetistas humanos detectan las mutaciones germinales por la aparición brusca de un fenotipo novedoso en un pedigrí sin registro previo de tal fenotipo. Las mutaciones dominantes, de las que se espera una expresión fenotípica inmediata, se detectan así con facilidad. Un ejemplo aparece en la Figura 15-16, que muestra un pedigrí de *neurofibromatosis*, enfermedad autosómica dominante caracterizada por una pigmentación anormal de la piel (machas «café con leche») y la aparición de numerosos tumores, llamados neurofibromas, asociados al sistema nervioso central o periférico. Tales tumores son visibles en la superficie del cuerpo, como se observa en la Figura 15-16. El pedigrí muestra que las generaciones ancestrales estaban libres de la neurofibromatosis, que apareció de pronto en los hijos de una pareja, en la generación IV. La mutación debió producirse en el tejido germinal de la madre o del padre. Resulta que las mutaciones génicas que provocan neurofibromatosis o acondroplasia se producen con una frecuencia muy alta en la especie humana, de manera que un gran número de casos de ambas enfermedades se deben a nuevas mutaciones. En el otro extremo encontramos al gen de la enfermedad de Huntington, que muestra la frecuencia más baja de mutación, así que la mayoría de los casos de esta enfermedad se heredan de generaciones anteriores. De hecho, la mayoría de los casos de enfermedad de Huntington de América del Norte pueden remontarse a dos familias de emigrantes.

Una mutación recesiva humana es más difícil de detectar. Dada su condición, la mutación no se expresa en heterocigosis y puede pasar inadvertida durante generaciones. Se manifestará sólo en los hijos de algún matrimonio consanguíneo o de un matrimonio entre personas no emparentadas que, por casualidad, son heterocigóticas. Las mutaciones recesivas ligadas al X se identifican más fácilmente que las mutaciones autosómicas recesivas. Ya hemos hablado del alelo de la hemofilia, ligado al X, presente en las familias reales europeas. La enfermedad no fue registrada en los árboles genealógicos hasta que la sufrió uno de los hijos de la Reina Victoria, así que el suceso mutacional debió ocurrir en el tejido germinal de la propia Reina Victoria o en el de alguno de sus padres. Un caso similar se muestra en la Figura 15-17. Es posible que el alelo estuviera presente en mujeres de generaciones anteriores, pero la ausencia de casos de hemofilia en un total de 11 predecesores varones hace muy improbable que tal fuera el caso.

¿Cómo podemos medir la frecuencia de sucesos mutacionales autosómicos recesivos? La respuesta empieza por tener en cuenta que, para cualquier fenotipo autosómico recesivo concreto, las



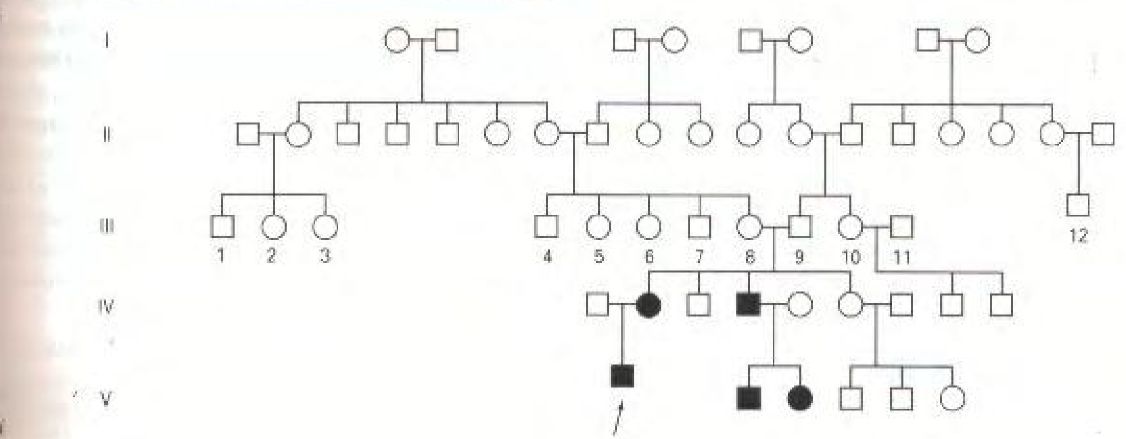


Figura 15-16. La mutación de la neurofibromatosis. (a) Neurofibromas. (b) Pedigrí que demuestra que la mutación responsable de la neurofibromatosis debió ocurrir en la línea germinal de III-8 ó III-9. (Parte a, de Michael English/Custom Medical Stock.)

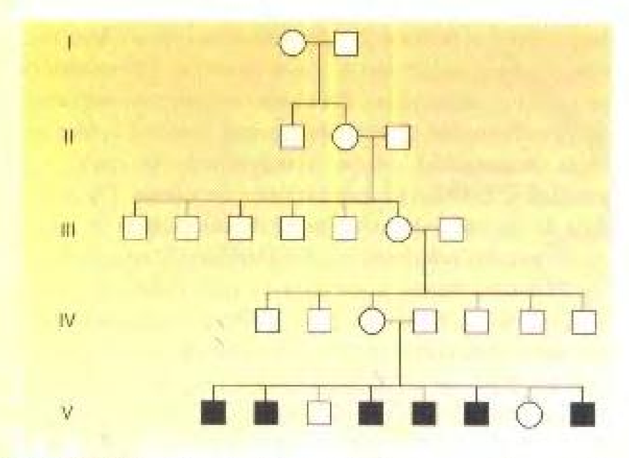


Figura 15-17. Mutación del gen ligado al cromosoma X responsable de la hemofilia.

mutaciones se están produciendo constantemente, acumulándose en la población como se acumula el agua de un grifo que gotea en un fregadero con el tapón puesto. Por otro lado, también se van eliminando de la población mediante reversión y selección, que serían como pérdidas de agua del fregadero si el tapón no está bien apretado. Las pérdidas y las ganancias terminan al final por igualarse, alcanzando una especie de equilibrio. Medir la frecuencia de fenotipos mutantes en situación de equilibrio ofrece una vía para calcular la frecuencia de mutación, como veremos en el Capítulo 24 dedicado a la Genética de las poblaciones.

Los organismos haploides presentan una gran ventaja respecto de los diploides en los estudios sobre las mutaciones. El sistema para detectar mutaciones en haploides es muy directo: cualquier alelo nuevo manifestará su presencia sin ser enmascarado por un alelo dominante del mismo gen. De hecho, el problema de la dominancia o recesividad ni siquiera se plantea, existiendo una especie de capacidad inherente del sistema para detectar mutaciones. En algunos casos, es posible detectar los mutantes directamente. En *Neurospora*, por ejemplo, se han encontrado mutantes auxótrofos para adenina afectados en varios loci distintos. Uno de éstos, *ad-3*, es único en cuanto que los mutantes auxótrofos por mutación en *ad-3* acumulan un pigmento púrpura en sus células cuando se cultivan en medios con una concentración baja de adenina. Así, los auxótrofos por mutación en este gen se pueden detectar simplemente permitiendo que grandes poblaciones de esporas asexuales formen colonias separadas en medio con baja concentración de adenina. Las colonias mutantes púrpuras se identifican fácilmente entre las colonias normales, de color blanco.

¿Qué ocurre con otros auxótrofos? Generalmente, no aparecen efectos pleiotrópicos visibles, como ocurre en el caso de *ad-3*. Más adelante en este capítulo, estudiaremos la técnica de detección más común, denominada réplica en placa.

¿Son frecuentes las mutaciones?

Antes de que un investigador pueda encontrar mutaciones es preciso diseñar un sistema de detección. Si dispone de él, puede iniciar una «caza de mutantes». Una conclusión resultará aparente de inmediato: en general, las mutaciones son muy poco frecuentes. Esto se puede apreciar en el Cuadro 15-2, que presenta algunos datos recopilados por Stadler cuando trabajaba con varios loci del maíz. Los estudios de este tipo requieren mucho esfuerzo. Contar un millón de *cualquier cosa* no es tarea fácil. Otro punto puesto de manifiesto en esos datos es que genes distintos presentan frecuencias de mutación diferentes: en el caso del maíz, las diferencias varían en un rango de 500 veces. Así pues, uno de los requisitos fundamentales del análisis de mutaciones es poder medir la tendencia a mutar de diferentes genes. Para cuantificar las mutaciones suelen emplearse dos términos: tasa de mutación y frecuencia de mutación. La **tasa de mutación** se expresa como el número de mutaciones que ocurren en alguna unidad de tiempo. Las unidades que se emplean normalmente son el período de tiempo correspondiente a la vida de una célula, de un organismo (generación) o de una división celular. Como ve, todos estos períodos de tiempo corresponden a unidades biológicas de tiempo.

Considere el linaje de células de la Figura 15-18. Sólo ha ocurrido un suceso mutacional (M), así que el numerador de la tasa de mutación queda establecido. ¿Qué ponemos en el denominador? El período de tiempo completo para la oportunidad de la mutación puede representarse por el número total de líneas de la Figura 15-18 (14 períodos generacionales) o, alternativamente, por el número total de divisiones celulares (7). Por ejemplo, podríamos establecer que la tasa de mutación es una por cada siete divisiones celulares.

La **frecuencia de mutación** es la frecuencia con la que se observa un tipo particular de mutación (o mutante) en una población

CUADRO 15-2. Frecuencias de mutación de algunos loci específicos del maíz

Gen	Número de gametos analizados	Número de mutaciones	Número medio de mutaciones por millón de gametos
$R \rightarrow r$	554 786	273	492.0
$I \rightarrow i$	265 391	28	106.0
$Pr \rightarrow pr$	647 102	7	11.0
$Su \rightarrow su$	1 678 736	4	2.4
$Y \rightarrow y$	1 745 280	4	2.2
$Sh \rightarrow sh$	2 469 285	3	1.2
$Wx \rightarrow wx$	1 503 744	0	0.0

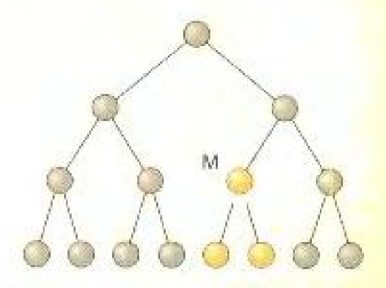


Figura 15-18. Linaje celular sencillo en el que se produce una mutación en M.

CUADRO 15-3. Tasas, o frecuencias, de mutación en varios organismos

Organismo	Mutación	Valor	Unidades
Bacteriofago T2 (virus bacteriano)	Inhibición de lisis $r \to r^+$	1×10^{-8}	*Tasa*: alelos mutantes por replicación génica
	Rango de hospedador $h^+ \to h$	3×10^{-9}	
Escherichia coli (bacteria)	Fermentación de lactosa $lac^- \to lac^+$	2×10^{-7}	*Tasa*: células mutantes por división celular
	Requerimiento de histidina $his^- \to his^+$	4×10^{-8}	
	$his^+ \to his^-$	2×10^{-6}	
Chlamydomonas reinhardtii (alga)	Sensibilidad a estreptomicina $str^s \to str^r$	1×10^{-6}	
Neurospora crassa (hongo)	Requerimiento de inositol $inos^- \to inos^+$	8×10^{-8}	*Frecuencia* por espora asexual
	Requerimiento de adenina $ad^- \to ad^+$	4×10^{-8}	
Maíz	Véase el Cuadro 15-2		
Drosophila melanogaster (mosca del vinagre)	Color de ojos $W \to w$	4×10^{-5}	*Frecuencia* por gameto
Ratón	Pelaje de color diluido $D \to d$	3×10^{-5}	
Especie humana			
Autosómicas dominantes	Enfermedad de Huntington	0.1×10^{-5}	
	Síndrome «uña-rótula»	0.2×10^{-5}	
	Epiloia (predisposición a un tipo de tumor cerebral)	$0.4 - 0.8 \times 10^{-5}$	
	Poliposis múltiple del intestino grueso	$1 - 3 \times 10^{-5}$	
	Acondroplasia (enanismo)	$4 - 12 \times 10^{-5}$	
	Neurofibromatosis (predisposición a tumores del sistema nervioso)	$3 - 25 \times 10^{-5}$	
Ligadas al X recesivas	Hemofilia A	$2 - 4 \times 10^{-5}$	
	Distrofia muscular de Duchenne	$4 - 10 \times 10^{-5}$	
En cultivos de células de médula ósea	Normal → resistencia a azaguanina	7×10^{-4}	*Tasa*: células mutantes por división celular

Fuente: tomado de R. Sager y F. J. Ryan, Heredity. John Wiley, 1961.

ción de células o de individuos. La población de células puede referirse a gametos, a esporas asexuales, o a casi cualquier otro tipo celular. En nuestro ejemplo de la Figura 15-18, la frecuencia de mutación de la población final de ocho células sería 2/8 = 0.25.

El Cuadro 15-3 muestra algunas tasas y frecuencias de mutación.

Sistemas selectivos

La baja frecuencia con que ocurren las mutaciones es un problema para el investigador que intenta conseguir una buena colección de mutantes de un tipo concreto para su estudio genético. Los genetistas utilizan dos estrategias distintas, no excluyentes, para paliar este problema. Una de ellas es el empleo de un **sistema selectivo**, un protocolo experimental diseñado especialmente para separar los tipos mutantes deseados de los restantes individuos. La otra estrategia es incrementar la tasa de mutación utilizando **mutágenos**, agentes cuyo efecto biológico es provocar mutaciones a una tasa mayor que la basal o espontánea. Trataremos la inducción de mutaciones más adelante, en este capítulo.

COROLARIO

La obtención de mutaciones poco frecuentes se facilita utilizando sistemas selectivos y mutágenos.

La mayoría de los sistemas selectivos que se presentan a continuación se refieren a microorganismos. Ello no significa que sean impracticables en estudios de organismos más complejos, sino, simplemente, que su aplicación a microbios resulta especialmente ventajosa. Producir un millón de esporas o de bacterias es fácil, mientras que generar un millón de ratones, o incluso un millón de moscas, requiere una inversión considerable de dinero, tiempo y espacio.

Reversión de auxótrofos

Hay un sistema directo de selección para detectar la reversión de una auxotrofía a una prototrofía. Tomemos como ejemplo un auxótrofo para adenina. Se crece un cultivo del mutante en medio con adenina. A continuación, se siembra un gran número de células en medio sólido sin adenina. Las únicas células capaces de crecer y dividirse en este medio son los protótrofos para adenina, que habrían surgido por reversión de la mutación en el cultivo original (Fig. 15-19). Para la mayoría de los genes (no sólo los relacionados con la nutrición), la tasa de reversión es generalmente mucho más baja que la tasa de mutación. Más adelante veremos la razón de ello.

Los primeros estudios sobre reversión de mutaciones auxotróficas pusieron de manifiesto una complicación que debe ser tenida en cuenta en cualquier experimento de reversión. Algunas

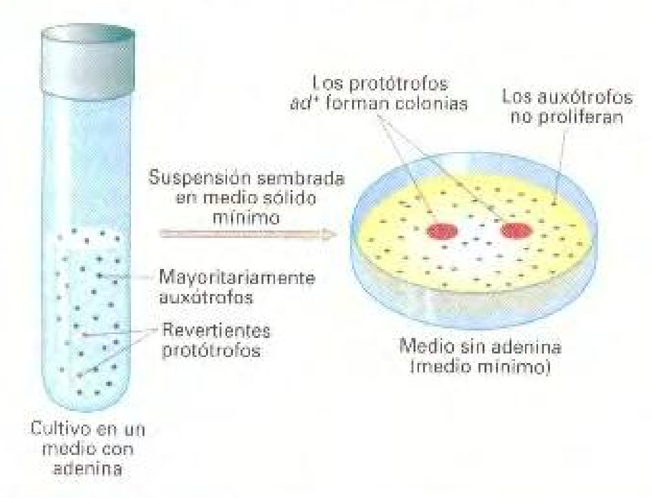


Figura 15-19. Selección de revertientes protótrofos a partir de un mutante auxótrofo para adenina.

colonias protótrofas resultaron no ser revertientes en absoluto, sino más bien casos en los que había ocurrido una mutación de ganancia de función en otro locus distinto. Esta segunda mutación actúa como supresora de la auxotrofía. Si representamos la mutación original como m y la supresora como s, el revertiente aparente era en realidad de genotipo $m\ s$. Las mutaciones supresoras suelen ser menos frecuentes que las reversiones. Pueden distinguirse de las reversiones mediante cruzamiento con una cepa silvestre y observación de la aparición de nuevo, entre los descendientes, del fenotipo mutante original:

$$m \cdot s \times + \cdot +$$
$$\downarrow$$
$$m \cdot s \text{ (protótrofo)}$$
$$+ \cdot + \text{ (protótrofo)}$$
$$+ \cdot s \text{ (protótrofo)}$$
$$m \cdot + \text{ (auxótrofo)}$$

Los descendientes de un cruzamiento de un revertiente verdadero, que sería m^+, con una cepa silvestre serían todos protótrofos.

COROLARIO

En cualquier estudio de reversión, debemos distinguir entre reversiones verdaderas y mutaciones supresoras en otro locus.

Enriquecimiento por filtración

Los hongos filamentosos, como *Neurospora* y *Aspergillus*, crecen como una masa de hifas, especie de cintas ramificadas. Los genetistas que estudian los hongos hacen uso de esta propiedad a la hora de seleccionar mutantes auxótrofos, empleando un procedimiento denominado **enriquecimiento por filtración**. Supongamos que un investigador está interesado en obtener auxótrofos que requieran específicamente el aminoácido leucina. Tales auxótrofos se originarán por mutaciones del tipo leu^+ a *leu* en uno de varios loci genéticos. El investigador comienza por crecer la estirpe silvestre, obteniendo de ella un gran número de conidiosporas. La mayoría de estas conidiosporas serán protótrofas para la leucina, como cabe esperar de un cultivo silvestre. No obstante, continuamente se están produciendo mutaciones espontáneas, así que algunas células serán auxótrofas para la leucina, siendo portadoras de un alelo mutante *leu*. Estas células se seleccionan del modo siguiente. Se colocan las conidiosporas en un frasco de medio mínimo líquido y se dejan crecer toda la noche, con una ligera agitación. Cada una de las conidiosporas protótrofas actúa como un centro de crecimiento, produciendo una colonia hecha de una red de hifas, a modo de tela de araña. Sin embargo, las auxótrofas de cualquier tipo, incluyendo las auxótrofas para la leucina, no crecen, sino que permanecen en suspensión como conodiosporas vivas. A continuación, se hace pasar el contenido del frasco a través de varias capas de una gasa fina, que actúan como filtro. Las colonias protótrofas quedan retenidas en las fibras del filtro, mientras que los mutantes auxótrofos unicelulares pasan a través del mismo (Fig. 15-20). Éstas se siembran entonces en placas de medio mínimo enriquecido con leucina. Cada uno de los auxótrofos para la leucina crecerá y formará una colonia visible, mientras que otros tipos de auxótrofos permanecerán como células individuales invisibles. A continuación, se aíslan las colonias con una aguja y se transfieren a tubos de medio enriquecido con leucina, donde podemos cultivarlas permanentemente. De esta manera resul-

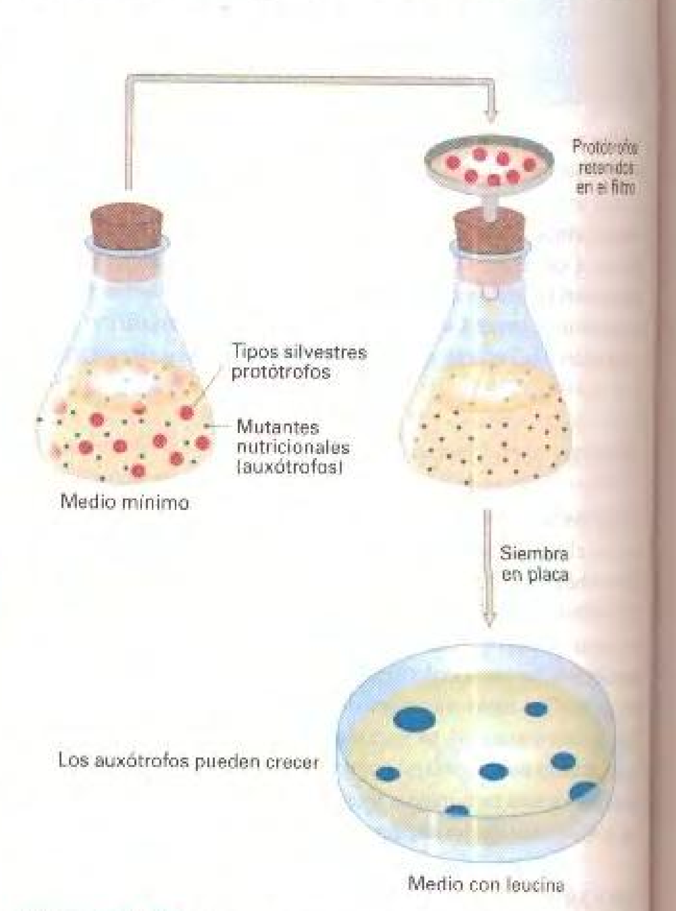


Figura 15-20. Método de enriquecimiento por filtración para seleccionar mutaciones de auxotrofía en hongos filamentosos. (Este ejemplo ilustra una mutación que provoca auxotrofía para leucina.)

Es relativamente fácil obtener un gran número de mutantes auxótrofos.

Enriquecimiento con penicilina

Existe una técnica análoga para la selección de auxótrofos en bacterias. Muchas especies bacterianas son sensibles al antibiótico penicilina, aunque sólo si están en fase de crecimiento. Si se añade penicilina a una suspensión de células en medio mínimo líquido, todas las protótrofas se mueren porque están dividiéndose, mientras que las auxótrofas sobreviven porque no pueden dividirse sin algún suplemento. Tras el tratamiento, puede eliminarse la penicilina lavando las células sobre un filtro. Al sembrar las células lavadas en medio mínimo enriquecido con un compuesto concreto, como el aminoácido leucina, permitiremos que se dividan selectivamente aquellas que son auxótrofas para leucina, que formarán colonias visibles.

Resistencia

Las mutaciones que confieren resistencia a agentes ambientales específicos, no tolerados por el silvestre, se ponen de manifiesto con facilidad en los microorganismos. Utilizaremos un ejemplo que fue importante históricamente en la determinación de la naturaleza de las mutaciones.

La bacteria intestinal *Escherichia coli* es parasitada por muchos fagos específicos. Uno de ellos, denominado T1, se utilizó en los primeros estudios sobre mutaciones bacterianas. El fago T1 ataca y mata a la mayoría de las células de *E. coli*, liberándose gran número de nuevos virus de cada célula bacteriana muerta. Si se siembra una placa con un número elevado de bacterias (alrededor de 10^9) y de fagos, la mayoría de las bacterias morirán. Sin embargo, sobrevivirán unas pocas bacterias y producirán colonias que pueden ser aisladas.

Cuando se observaron las primeras bacterias resistentes a T1, se ignoraba su origen, pero existían dos hipótesis explicativas. Según una de ellas, la resistencia se debería a mutaciones al azar de un alelo silvestre que confiere sensibilidad al fago (Ton^s, del inglés *T ONe*) a un alelo que provoca resistencia al mismo (Ton^r). Según la otra hipótesis, las bacterias detectarían de algún modo la presencia de los fagos y ajustarían de tal manera su fisiología celular que algunas células conseguirían resistir la infección. Este ajuste sería similar al que permite a las bacterias cambiar su fisiología para utilizar un nuevo nutriente presente en el medio. En 1943, Salvadore Luria y Max Delbrück diseñaron un experimento ya clásico para distinguir entre esas dos hipótesis. Su diseño experimental fue denominado la prueba (o test) de la fluctuación. Esta prueba no sólo resultó ser históricamente importante por desentrañar el origen de las bacterias resistentes a fagos, sino que ofreció también un procedimiento para calcular tasas de mutación que sigue empleándose hoy día.

Luria y Delbrück se dieron cuenta de que las dos hipótesis, mutación o cambio fisiológico, llevaban a distintas predicciones respecto del número de bacterias resistentes que debían aparecer en una serie de cultivos. Según la primera hipótesis, cuando ocurriera un suceso raro de mutación, tal suceso podría producirse relativamente pronto o relativamente tarde, durante el crecimiento del cultivo, ya que, probablemente, la mutación es un fenómeno aleatorio a lo largo del tiempo. Un suceso temprano daría lugar a un clon de células descendientes resistentes más numeroso que un suceso tardío. Así pues, cabría esperar una variación considerable en el número de células resistentes de un cultivo a otro (Luria y Delbrück emplearon el término fluctuación en lugar de variación). En la hipótesis del cambio fisiológico, no habría razón para esperar tal variación; probablemente, el «conmutador» fisiológico sería bastante constante en su funcionamiento. Estas predicciones distintas se representan esquemáticamente en la Figura 15-21.

Los detalles prácticos del experimento fueron los siguientes. Introdujeron 10^3 células de *E. coli* por mililitro en cada uno de 20 tubos separados que contenían 0.2 mL de medio de cultivo y en uno que contenía 10 mL, y los incubaron hasta obtener unas 10^8 células por mililitro. Cada uno de los cultivos de 0.2 mL se extendió por separado en una placa que había sido cubierta de una densa capa de fagos T1. Hicieron también lo mismo con 10 muestras de 0.2 mL tomadas del cultivo «masivo» de 10 mL. Como aparece en el Cuadro 15-4, aparecieron muchas colonias resistentes a T1.

Si la resistencia se debiera a la mutación al azar durante el período de incubación, en cada uno de los 20 tubos de cultivos pequeños se habría producido un número distinto de células resistentes: el número dependería de cuán temprano hubiera ocurrido la mutación en la cascada de multiplicación celular. Cada una de las células resistentes produciría una colonia separada al sembrarlas sobre los fagos T1. Si la resistencia se debiera a un fenómeno de adaptación fisiológica, se esperaría que, tras la ex-

CUADRO 15-4. Los resultados del experimento de Luria y Delbrück

CULTIVOS INDIVIDUALES		CULTIVO MASIVO	
Número del cultivo	Número de colonias resistentes a T1	Número del cultivo	Número de colonias resistentes a T1
1	1	1	14
2	0		
3	3	2	15
4	0		
5	0	3	13
6	5		
7	0	4	21
8	5		
9	0	5	15
10	6		
11	107	6	14
12	0		
13	0	7	26
14	0		
15	1	8	16
16	0		
17	0	9	20
18	64		
19	0	10	13
20	35		
	Media: 11.3		Media: 16.7

(a) Adaptación fisiológica

Cultivo 1 | Cultivo 2 | Cultivo 3 | Cultivo 4

(b) Mutación al azar

Cultivo 1 | Cultivo 2 | Cultivo 3 | Cultivo 4

Figura 15-21. Linajes celulares que ilustran los resultados que se esperarían de acuerdo con dos hipótesis opuestas sobre el origen de las células resistentes. (De G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.ª ed. W. H. Freeman and Company, 1978.)

posición de las células al fago T1, la tasa de aparición de células resistentes fuera aproximadamente la misma de un cultivo a otro.

En las placas sembradas con los cultivos individuales de 0.2 mL se observó una variación notable de una a otra, variación que no se observó en las muestras procedentes del cultivo «masivo» (que representan una especie de control). Estos resultados no pueden explicarse por adaptación fisiológica, teniendo en cuenta que todas las muestras sembradas tenían un número aproximadamente igual de células. La explicación más sencilla es la de la mutación aleatoria, que en los cultivos de 0.2 mL habría ocurrido pronto (generando un número elevado de células resistentes y, por tanto, un número elevado de colonias), tarde (generando pocas células resistentes y colonias), o en ningún momento (ninguna célula resistente).

Este análisis sugiere que la acción del agente ambiental (fagos en este caso) consiste en seleccionar aquellas células que ya eran resistentes, no inducir su aparición. ¿Puede demostrarse directamente la existencia de mutantes en una población antes de la selección? Tal demostración fue posible mediante un método conocido como **réplica en placa**, desarrollado por Joshua Lederberg y Esther Lederberg en 1952. Se extendió una población de bacterias en placas de medio no selectivo —es decir, sin fagos— y cada una de ellas formó una colonia. Esta placa se denomina placa matriz. Sobre la superficie de la placa matriz se

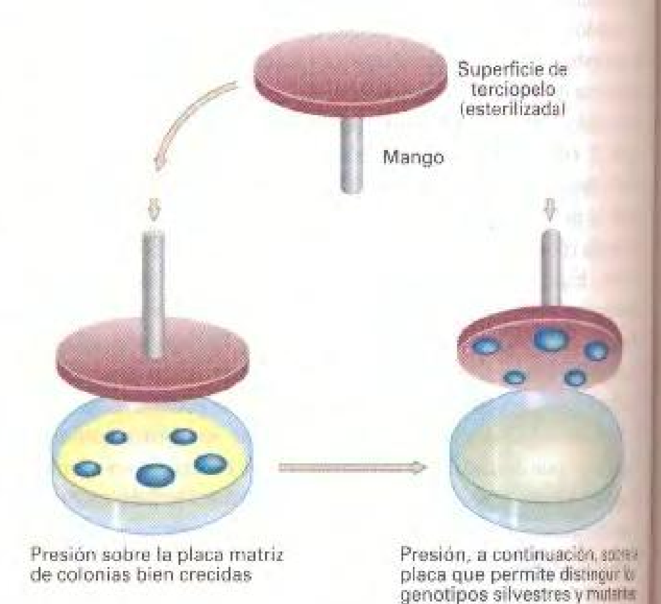


Figura 15-22. El método de la réplica en placa se utiliza para revelar qué colonias de una placa matriz son mutantes, de acuerdo con su comportamiento tras ser replicadas en placas de medio selectivo. (De G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.ª ed. W. H. Freeman and Company, 1978.)

aplicó suavemente un trozo estéril de terciopelo, que quedó impregnado de células allí donde había una colonia (Fig. 15-22). El terciopelo aparece, pues, como una «copia» de toda la placa matriz. Al aplicar el terciopelo a nuevas placas con medio selectivo (es decir, con fagos T1), algunas células adheridas al terciopelo se depositarán sobre la superficie de la placa, en las mismas posiciones relativas que las colonias de la placa matriz. Como se esperaba, se formaron unas pocas colonias mutantes Ton^r en las placas de réplica, pero todas ellas mostraron el mismo patrón de distribución de colonias resistentes (Fig. 15-23). Si las mutaciones hubieran ocurrido después de la exposición al agente selectivo, los patrones de cada placa habrían sido tan aleatorios como las propias mutaciones. Los sucesos mutacionales debieron ocurrir antes de la exposición al agente selectivo.

COROLARIO

La mutación es un proceso aleatorio. Cualquier alelo de cualquier célula puede mutar en cualquier momento.

La réplica en placa se ha convertido en una técnica importante en Genética microbiana. Es muy útil para rastrear mutantes que resultan incapaces de crecer en alguna condición selectiva. La posición de una placa de réplica en la que falta una colonia se utiliza para identificar la colonia mutante en la placa matriz. Por ejemplo, así pueden identificarse precisamente mutantes auxótrofos.

La réplica en placa es un método general de conservar un conjunto original de estirpes en una placa matriz y someterlas simultáneamente a una serie de pruebas en varios tipos de medios y condiciones ambientales distintas.

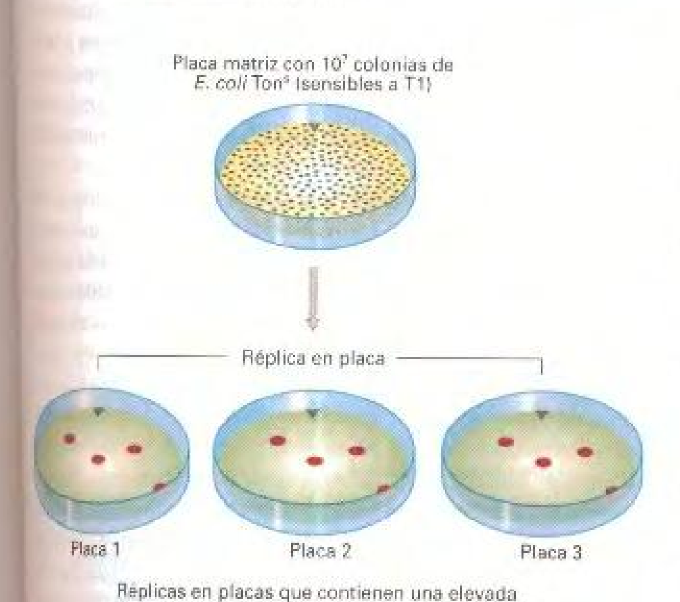


Figura 15-23. Réplica en placa para demostrar la existencia de mutantes antes de la selección. Que el patrón de aparición de colonias resistentes sea idéntico en todas las réplicas indica que las colonias resistentes estaban ya en la placa matriz. (De G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.ª ed. W. H. Freeman and Company, 1978.)

Una forma de calcular la tasa de mutación

Veamos cómo el test de fluctuación de Luria y Delbrück permite calcular la tasa de mutación. Considere los 20 cultivos que se probaron respecto a la resistencia a T1. Tenemos una situación que puede ser descrita adecuadamente por la distribución de Poisson, ya que existe una gran probabilidad de encontrar mutaciones, pero la clase más frecuente (11 de 20) es la de los cultivos que no contienen ninguna. Eche otro vistazo a la Figura 15-18 y convénzase de que el número de divisiones celulares necesarias para producir n células es n menos el número inicial de células en el cultivo (en el ejemplo de la Fig. 15-18 sería $8 - 1 = 7$). Si n es muy grande, como ocurre en los cultivos del test de fluctuación, y el número original de células es relativamente pequeño, entonces el mismo valor n es una estimación suficientemente exacta del número de divisiones celulares. Si la tasa de mutación por división celular es μ, se espera que cada cultivo haya sufrido una media de μn sucesos mutacionales. La distribución de Poisson (véase pág. 177) nos dice que la clase cero, aquella en la que no aparecen mutantes, será igual a $e^{-\mu n}$. Como sabemos que la clase cero $= 11/20 = 0.55$ y que $n = 0.2 \times 10^8$, podemos resolver la siguiente ecuación para μ:

$$0.55 = e^{-\mu(0.2 \times 10^8)}$$

De aquí, $\mu = 3 \times 10^{-8}$ sucesos mutacionales por división celular. [Observe que, con los mismos datos, la frecuencia de mutación es $(1 + 3 + 5 + 5 + 6 + 107 + 1 + 64 + 35)/(20 \times 0.2 \times 10^8)$, que equivale a $227/(4 \times 10^8)$, o 5.7×10^{-7}.]

Cómo identificar mutaciones en cultivos de células vegetales y animales

Las células de ciertos tejidos animales y vegetales, incluyendo tejidos cancerosos, se dividen mitóticamente en cultivo, de forma parecida a las células microbianas. Además, muchas de las técnicas utilizadas para inducir y seleccionar mutaciones en los microorganismos pueden aplicarse también a estas células vegetales y animales, haciendo así posible la **Genética de células somáticas** de plantas y animales. La combinación de estas técnicas de mutación-selección y escrutinio con técnicas sofisticadas de fusión celular y generación de híbridos permite ahora la aplicación de una amplia gama de manipulaciones *in vitro* de células superiores, incluyendo las células humanas.

Un sistema habitual de cultivo celular utiliza células de ovario de hámster chino (CHO). Con éste y otros sistemas se han aislado muchos tipos celulares mutantes. Veamos algunos ejemplos. En primer lugar, las mutaciones dominantes pueden ser seleccionadas directamente. En este contexto, la dominancia se define por el fenotipo observado en células híbridas generadas por la fusión de una célula mutante con otra normal. Algunas mutaciones que confieren resistencia a una droga concreta, como la ouabaína, la α-amanitina, el metotrexato o la colchicina, son dominantes. Encontrar mutaciones dominantes no debe sorprendernos. De hecho, como las células son diploides, esperaríamos encontrar *sólo* mutaciones dominantes, quedando ocultas las mutaciones recesivas.

No obstante, también las mutaciones recesivas son comunes. Alelos que confieren resistencia a lectinas, 8-azaguanina o me-

totrexato, o que provocan auxotrofía para glicina, prolina o lisina, así como varios alelos letales termosensibles son ejemplos de mutaciones recesivas halladas en cultivos de células CHO. Tenga presente que, dependiendo del alelo responsable, ciertos fenotipos mutantes pueden ser dominantes o recesivos. ¿Cómo es posible que aparezcan fenotipos mutantes recesivos en cultivos de células diploides CHO? Desconocemos la verdadera respuesta a esta pregunta. Sin embargo, hay pruebas de que, aunque predominantemente diploides, algunas células CHO de un cultivo resultan ser hemicigóticas para pequeñas regiones del genoma. Así pues, mutaciones recesivas que ocurrieran en esas regiones sí se manifestarían. Pero cualquiera que sea la razón de la aparición de tales fenotipos recesivos, los alelos mutantes correspondientes resultan ser valiosos marcadores para la Genética de células somáticas.

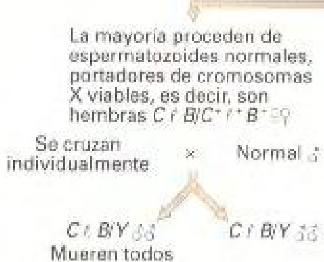
Para cultivar células individuales de plantas, el genetista las siembra en un medio sintético que contiene combinaciones adecuadas de hormonas vegetales. Las colonias resultantes, denominadas **callos**, pueden ser subdivididas para su proliferación en nuevos cultivos, o pueden ser transferidas a un medio diferente que induce la diferenciación de raíces y tallos. Tales plántulas pueden trasplantarse a tierra para que desarrollen una planta adulta. En una aplicación de esta técnica, se seleccionaron células de cierta planta resistentes a una toxina producida por un hongo parásito de la misma. A partir de callos que crecieron en placas que contenían la toxina, se obtuvieron plantas que resultaron ser también resistentes a la toxina y, por tanto, al hongo parásito.

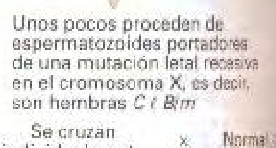
Inducción de mutaciones

En los organismos multicelulares es mucho más difícil detectar mutaciones que en los microorganismos. De manera que han debido diseñarse técnicas especiales para ampliar en lo posible el espectro de sistemas de selección de mutantes. En 1928, Hermann J. Muller diseñó un método para buscar mutaciones letales en el cromosoma X de *Drosophila*. Primero «construyó» un cromosoma denominado *ClB*. *C* indica la presencia de una reorganización cromosómica denominada inversión, de la que hablaremos en el Capítulo 17. Por ahora, piense en ella como algo que suprime la recombinación, ya que en una mosca hembra que lleva este cromosoma especial *ClB* y un cromosoma X normal no se produce entrecruzamiento de cromátidas. El cromosoma *ClB* lleva también el alelo *l*, un alelo letal recesivo, y el alelo *B* que provoca un fenotipo mutante dominante conocido como «ojo en barra». Los machos *C l B/Y* se mueren, debido a la hemicigosis del alelo letal, pero el cromosoma puede mantenerse en hembras heterocigóticas $C\ l\ B/C^+\ l^+\ B^+$. Este sistema especial *ClB* permitió a Muller buscar mutaciones letales en cualquier lugar de cromosomas X presentes en gametos masculinos. El protocolo experimental aparece en la Figura 15-24. Hembras de ojos en barra, hijas del cruzamiento entre hembras heterocigóticas y machos silvestres, se cruzaron individualmente con machos silvestres. Cada una de ellas depositó los huevos en un tubo separado. Tras la eclosión de los huevos, se comprobó la presencia de machos en cada tubo. Vemos que si hubiera ocurrido una mutación letal recesiva en un cromosoma X de uno de los gametos masculinos originales, la hembra F_1 portadora de ese cromosoma no habría producido ningún descendiente masculino viable. Tenga en cuenta que sólo rara vez la nueva mutación letal *m* del cromosoma X será un alelo del locus *l* (si fuera así, las hembras *C l B/l* habrían muerto). La ausencia de machos en un vial se detecta sin dificultad con una lupa, permitiendo identificar con facilidad la presencia de mutaciones letales recesivas en el cromosoma X. Muller encontró una frecuencia espontánea de este tipo de mutaciones recesivas de 1.5 por cada 1000 cromosomas, que sigue siendo un valor pequeño para un cromosoma entero.

Muller se preguntó entonces si habría agentes que aumentaran la tasa de mutación. Utilizando el test *ClB*, midió la frecuencia de mutaciones letales ligadas al X tras irradiar machos con rayos X y descubrió que resultaba ser mucho mayor que la de los controles sin irradiar. Sus resultados aportaron la primera prueba experimental de la existencia de un mutágeno, en este caso los rayos X. Recuerde que un **mutágeno** es un agente causante de que las mutaciones ocurran con una frecuencia superior a la espontánea. Los mutágenos han sido muy útiles, no sólo para estudiar el propio proceso de la mutación, sino también para aumentar el rendimiento en la obtención de mutantes para otros análisis genéticos.

Hoy conocemos muchos otros tipos de radiaciones que aumentan la frecuencia de mutación. El Cuadro 15-5 muestra el efecto de varios tipos de radiaciones sobre la frecuencia de mutación en *Drosophila*. La luz ultravioleta (UV) es también mutagénica y debe añadirse a la lista del Cuadro 15-5. Las radiacio-







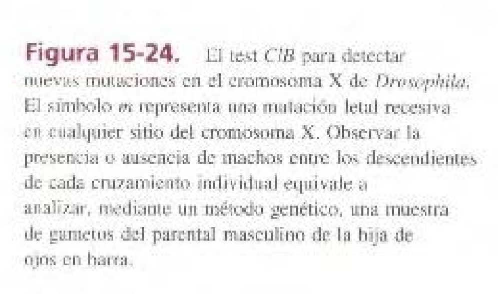


Figura 15-24. El test *ClB* para detectar nuevas mutaciones en el cromosoma X de *Drosophila*. El símbolo *m* representa una mutación letal recesiva en cualquier sitio del cromosoma X. Observar la presencia o ausencia de machos entre los descendientes de cada cruzamiento individual equivale a analizar, mediante un método genético, una muestra de gametos del parental masculino de la hija de ojos en barra.

CUADRO 15-5. Eficacia relativa de varios tipos de radiación como inductoras de mutaciones en *Drosophila*

Tipo de radiación	Porcentaje de cromosomas X de machos portadores de mutaciones letales recesivas después de una dosis de 1000 roentgens*
Luz visible (espontáneas)	0.15
Rayos X (25 Mev)	1.70
Rayos β, rayos γ, rayos X de alta energía	2.90
Rayos X de baja energía	2.50
Neutrones	1.90
Rayos α	0.84

* El roentgen (r) es una unidad de energía de radiación.

nes suelen clasificarse en *inonizantes* y *no ionizantes*, dependiendo de si se producen o no iones en el tejido expuesto a la radiación. Los rayos X y γ (gamma), por ejemplo, producen iones, y la luz UV no.

El aprovechamiento de la energía nuclear ha sido objeto de controversia social debido al poderoso efecto mutagénico de la radiación nuclear. Incluso en ausencia de una guerra nuclear, muchos usos pacíficos de la energía nuclear —en especial, su uso como combustible— no están exentos de riesgo. No existe un sistema infalible de almacenamiento, y en las últimas décadas hemos visto muchos casos de liberación accidental de isótopos nucleares, causados por explosiones y escapes en plantas nucleares. Por otro lado, la eliminación de los residuos radiactivos no resulta tan fácil como se supuso en un principio. Así pues, si se atiende al punto de vista ecológico, el uso de la energía nuclear presenta tanto ventajas como inconvenientes, y debemos ser cada uno de nosotros quienes sopesemos individualmente los pros y los contras de su uso.

Sabemos que la inducción de mutaciones puntuales es lineal, dentro de un cierto rango de dosis de radiación; es decir, si duplicamos o reducimos a la mitad el nivel de radiación, el número de mutantes producidos experimenta la variación correspondiente. A partir del tipo de gráfica representado en la Figura 15-25, pueden hacerse extrapolaciones a niveles de radiación muy bajos e inferir frecuencias de inducción de mutaciones muy pequeñas. Puesto que la exposición a las radiaciones cósmicas, a las que proceden de los aparatos de rayos X, a la lluvia radiactiva generada en pruebas atómicas y a la contaminación procedente de centrales nucleares es muy baja en su conjunto, podemos concluir que sus efectos son despreciables. Sin embargo, aunque el aumento en las tasas de mutación puede ser pequeño, el número de personas expuestas es muy grande: en el mundo, cada año, 200 millones de gametos se unen para formar 100 millones de recién nacidos. En este «experimento de mutación» anual, incluso frecuencias de mutación bajas pueden traducirse en un número elevado de mutaciones.

En general, las dosis de radiación son acumulativas. Si una población de organismos se expone repetidamente a radiación, la frecuencia de mutaciones inducidas estará en proporción directa a la cantidad total de radiación absorbida a lo largo del tiempo. Hay, no obstante, excepciones a este efecto acumulativo. Por ejemplo, si se comparan ratones sometidos a *x* rads (una medida biológica de la dosis de radiación) en una sola dosis (*dosis aguda*) con ratones expuestos a la misma dosis de forma gradual a lo largo de semanas o meses (*dosis crónica*), se encuentra un número de mutaciones significativamente menor en el grupo expuesto a la dosis crónica. Esta observación se ha interpretado como prueba de la existencia de algún tipo de reparación a lo largo del tiempo de los daños genéticos inducidos por las radiaciones. Los mecanismos de reparación de mutaciones se tratan en el próximo capítulo.

En 1947, Charlotte Auerbach y J. M. Robson realizaron experimentos con el gas mostaza, un gas tóxico utilizado anteriormente como arma química. Demostraron que, además de tóxico, el gas mostaza resultaba ser un potente mutágeno. Este estudio pionero abrió paso a la investigación del efecto mutagénico de muchos otros productos químicos, y sabemos hoy que muchos de los compuestos a los que estamos expuestos en nuestra vida diaria son mutagénicos. Un ejemplo obvio es el humo del tabaco, pero hay otros muchos, incluyendo ciertos conservantes, pesticidas, herbicidas, productos industriales y contaminantes. Incluso existen algunos mutágenos químicos naturales en nuestros alimentos.

Ciertamente, algunos productos químicos son mutágenos tan potentes que los genetistas los usan de forma rutinaria para inducir mutaciones en sus organismos de estudio. Desde el punto de vista experimental, la capacidad mutagénica de los productos químicos es importante porque, en muchos casos, conocemos las

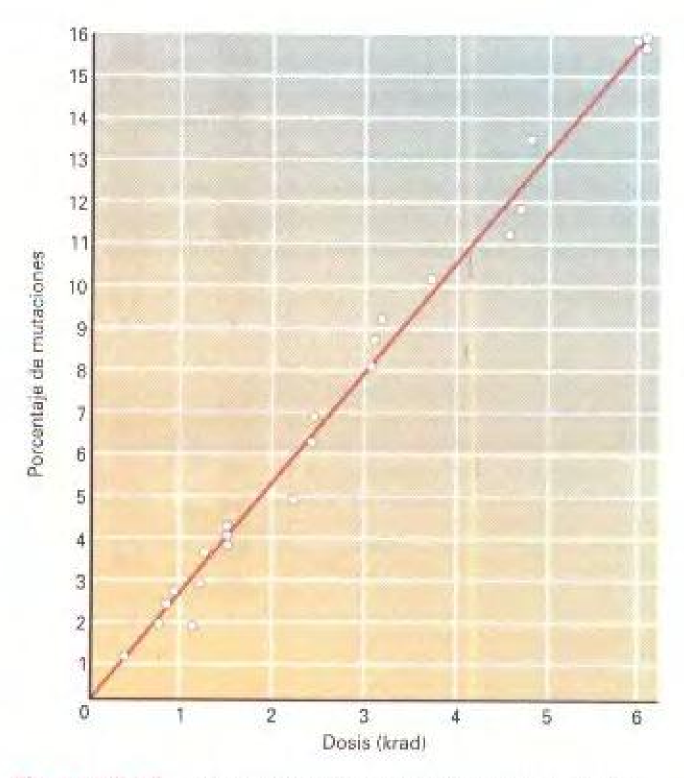


Figura 15-25. Relación lineal entre la dosis de rayos X a la que fue sometida *D. melanogaster* y el porcentaje de mutaciones (principalmente, letales recesivas ligadas al sexo.)

reacciones químicas responsables de su acción mutagénica y este conocimiento se puede aprovechar para inducir mutaciones de un tipo concreto. Además, muchos productos químicos son mucho menos tóxicos para un organismo que las radiaciones y, sin embargo, producen frecuencias de mutación mucho mayores. Por ello, los mutágenos químicos se han utilizado para inducir gran parte de la amplia gama de mutaciones disponibles hoy para estudios genéticos. El mecanismo de acción de los mutágenos químicos se trata en el Capítulo 16.

Mutación y cáncer

Hoy estamos seguros de que el cáncer es una enfermedad genética. El cáncer tiene muchas causas, pero, en última instancia, todas ellas ejercen su efecto sobre una clase especial de genes que llamamos *genes cancerígenos* o *protooncogenes*. Como aparece en la Figura 15-26, muchos de esos protooncogenes han sido cartografiados e identificados. Los protooncogenes son responsables normalmente de funciones celulares básicas, relacionadas generalmente con la regulación de la división celular. Pero varios tipos de sucesos pueden transformar un protooncogén en un oncogén, es decir, en una forma que provoca las dos características principales de un cáncer: (1) división celular incontrolada que conduce al crecimiento excesivo de un grupo de células que denominamos *tumor*, y (2) propagación de las células tumorales por todo el organismo para formar nuevos tumores, proceso conocido como **metástasis**. Una de las vías principales por las que un protooncogén puede cambiar a su forma causante de un cáncer (oncogénica) es la mutación. Producida una mutación espontánea, o inducida por agentes ambientales, en un protooncogén de una célula individual, ésta sufre entonces múltiples divisiones celulares hasta transformarse en un tumor. Observe que todas las células del tumor son portadoras del oncogén mutado, de manera que el tumor es un clon mutante. En este sentido el cáncer es una enfermedad genética, provocada por una mutación somática.

Muchas de las mutaciones que provocan cáncer son reparadas por los sistemas celulares de reparación (Cap. 16). Las que escapan a la reparación son las que provocan el tumor. Algunos aspectos del cáncer como enfermedad genética somática se resumen en la Figura 15-27. Los aspectos genéticos del cáncer se tratan en el Capítulo 22.

Los mutágenos en el análisis genético

Las mutaciones constituyen la base del análisis genético. Del mismo modo que podemos averiguar cómo funciona el motor de un coche estropeando sus componentes uno por uno y viendo el efecto producido cada vez, podemos aprender cómo funciona una célula o un organismo alterando cada una de sus partes por separado mediante mutaciones inducidas. El análisis de mutacio-

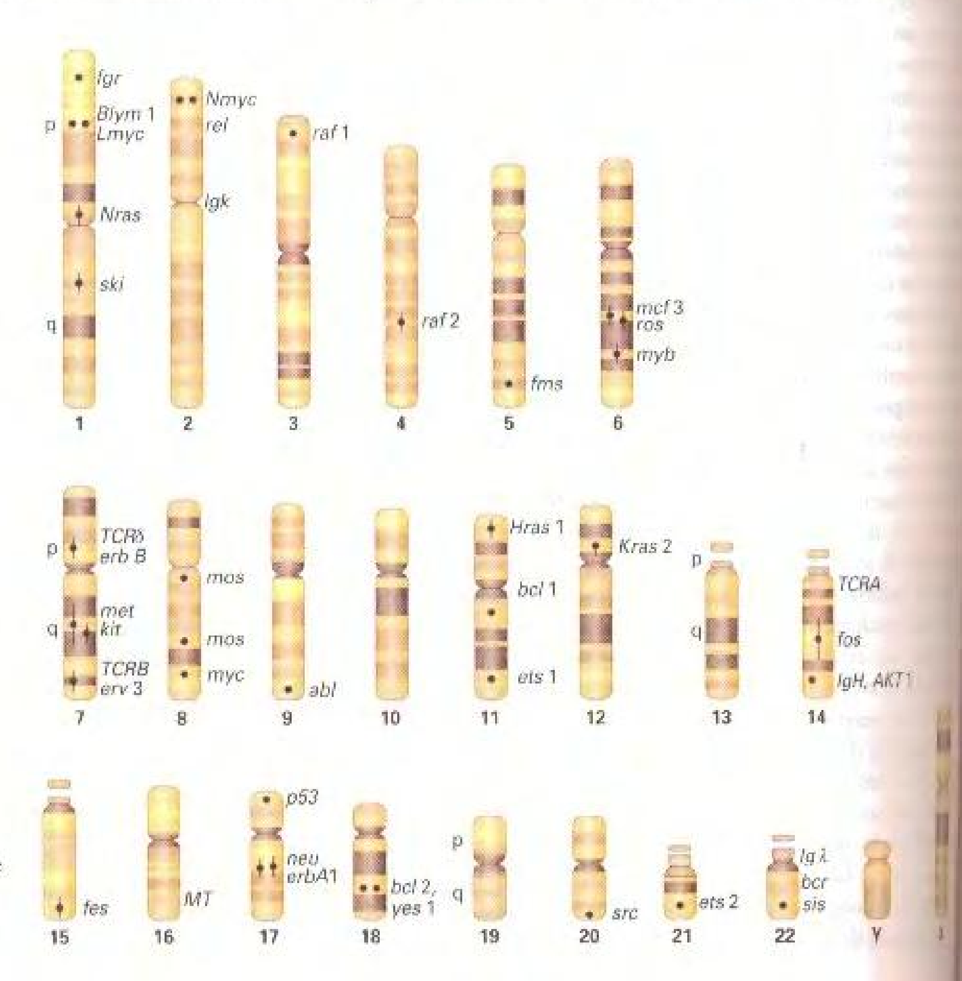


Figura 15-26. Cromosomas humanos mostrando las bandas típicas de la tinción con Giemsa y las posiciones de varios protooncogenes conocidos (puntos negros): mutaciones en los protooncogenes provocan cáncer.

CUADRO 15-6. Frecuencias de mutación directa obtenidas en *Neurospora* con varios mutágenos

Tratamiento mutágeno	Tiempo de exposición (minutos)	Supervivencia (%)	Número de mutantes *ad-3* por cada 10^6 supervivientes
Sin tratamiento (tasa espontánea)	—	100	~0,4
Aminopurina (1-5 mg/mL)	Durante el crecimiento	100	3
Metanosulfonato de etilo (1 %)	90	56	25
Ácido nitroso (0,05 M)	160	23	128
Rayos X (2000 r/min)	18	16	259
Metanosulfonato de metilo (20 mM)	300	26	350
Rayos UV (600 erg/mm²/min)	6	18	375
Nitrosoguanidina (25 μM)	240	65	1500
Mostaza de acridina ICR-170 (5 μg/mL)	480	28	2287

Nota: este ensayo mide la frecuencia de colonias púrpuras *ad-3* entre las colonias blancas generadas por el silvestre *ad-3*⁺.

tes es un aspecto más del proceso que hemos denominado *disección genética* de los seres vivos. Como hemos visto, la primera etapa en cualquier disección mutacional es la búsqueda (caza) de mutantes. La efectividad de la búsqueda puede aumentarse drásticamente si se usan mutágenos. Veamos algunos ejemplos.

Primero, el Cuadro 15-6 muestra las frecuencias relativas de mutantes *ad-3* de *Neurospora* después de varios tratamientos mutagénicos. Observe que para obtener un solo mutante sin tratamiento mutagénico previo habría que analizar 2,5 millones de células, mientras que el tratamiento con ICR-170 produce un mutante por cada 450 células supervivientes. El Cuadro 15-7 nos muestra otro ejemplo del aumento considerable en el número de mutantes cuando se utiliza un mutágeno adecuado. El término **supermutágeno** se utiliza para designar algunos de estos agentes extremadamente mutagénicos.

Como tercer ejemplo volvamos a *Drosophila*. Hasta mediados de los años sesenta, la mayoría de los investigadores que trabajaban con *Drosophila* usaban radiaciones para inducir mutaciones. Dosis de 4000 roentgens producen mutaciones letales en alrededor del 10 al 11 % de todos los cromosomas X de machos irradiados. Dosis mayores, sin embargo, provocan cada vez más esterilidad de las moscas tratadas. Otro problema es que muchas de las mutaciones inducidas por rayos X corresponden a reorganizaciones cromosómicas y tales reorganizaciones complican el análisis genético.

Por contraste, el compuesto metanosulfonato de etilo (EMS) induce una proporción mucho mayor de mutaciones puntuales. Este mutágeno se administra fácilmente, colocando a las moscas adultas en un filtro saturado con una mezcla de azúcar y EMS.

Figura 15-27. Comparación de las diferentes consecuencias de una mutación somática en un protooncogén o en otro gen cualquiera.

CUADRO 15-7. Eficacia de varios mutágenos químicos en la inducción de reversiones de una mutación *his* en *Salmonella*

Mutágeno	Revertientes por nanomol	Cociente de eficacia*
1,2-Epoxibutano	0,006	1
Clorobenzilo	0,02	3
Metanosulfonato de metilo	0,63	105
2-Naftilamina	8,5	1400
2-Acetilaminofluoreno	108	18 000
Aflatoxina B	7057	1 200 000
Furilfuramida (AF-2)	20 800	3 500 000

* Eficacia relativa de cada mutágeno, comparada con la del 1,2-epoxibutano.
Fuente: tomado de J. McCann y B. N. Ames, en W. G. Flamm y M. A. Mehlman, eds., *Advances in Modern Toxicology*, vol. 5. Hemisphere Publishing Corp., 1976.

La simple ingestión del EMS provoca un elevado número de mutaciones. Por ejemplo, los machos alimentados con EMS 0.025 M producen espermatozoides portadores de alelos letales en más del 70 % de los cromosomas X y en casi todos los cromosomas 2 y 3. A estos niveles de inducción de mutaciones, resulta bastante fácil buscar muchas mutaciones en loci específicos o detectar defectos fenotípicos poco frecuentes.

En el sistema *ClB*, para identificar alelos letales recesivos ligados al X era necesario acudir a la segunda generación de descendientes para comprobar la letalidad. Es posible, sin embargo, utilizar directamente la generación F_1 para analizar un cromosoma X en búsqueda de mutaciones recesivas viables, haciendo uso de una reorganización especial del cromosoma X llamada **X-unido** (representado como $\hat{X}X$). Un cromosoma X-unido es un cromosoma compuesto formado por la fusión de dos cromosomas X distintos, que se hereda como una unidad. Como aparece en la Figura 15-28, machos tratados con EMS se cruzan con hembras portadoras de un X-unido y un cromosoma Y ($\hat{X}X$/Y) (si necesita repasar la determinación del sexo en *Drosophila*, vuelva al Cap. 2). Los gametos de la hembra son $\hat{X}X$ ó Y. Todos los machos F_1 llevan un cromosoma X paterno mutagenizado, cada uno de un espermatozoide tratado distinto. Todos los cigotos F_1 portadores de alelos letales ligados al sexo mueren, pero cualquier mutación nueva ligada al X que dé lugar a un fenotipo visible se expresará en los machos. Dada la eficacia del método, es posible aislar un amplio rango de mutaciones en cualquier región concreta del genoma que pueda colocarse en hemicigosis, un procedimiento conocido como **mutagénesis de saturación**.

Los genetistas pueden, además, avanzar en el estudio de las mutaciones: si machos individuales de la F_1 se cruzan con hembras $\hat{X}X$/Y, cada descendencia resultante representa un cromosoma X individual «clonado». Las moscas F_1 pueden criarse a 22 °C, y luego los clones descendientes de cada X individual criarse a 29 °C y a 17 °C, para detectar así alelos letales sensibles al calor o al frío. Tales mutantes letales «termosensibles» (ts) constituyen entre el 10 y el 12 % de todos los mutantes letales inducidos por EMS. Ya hemos visto cuán útiles son tales mutantes condicionales para el análisis genético. Actualmente, muchos laboratorios realizan rutinariamente este tipo de prueba de mutantes ts en sus experimentos con *Drosophila*. Tal estrategia es posible gracias a la facilidad para obtener un gran número de mutantes.

La disponibilidad de mutantes letales ts ofrece un beneficio adicional, en cuanto que simplifica ciertos protocolos de laboratorio. Una de las tareas más fastidiosas en cualquier experimento con *Drosophila* a gran escala es la de separar las hembras de los machos durante las doce horas posteriores a la eclosión de la pupa, para evitar así apareamientos no deseados (las moscas no se aparean durante las 12 a 14 horas siguientes a la eclosión). Una tarea tan pesada puede evitarse si se usan alelos letales ts (representados como l^{ts}) para producir a voluntad crías de un solo sexo. Por ejemplo, un cruzamiento entre hembras $\hat{X}X$/Y y machos l^{ts}/Y produce descendientes de ambos sexos a la temperatura permisiva. Pero si el cultivo se cambia a la temperatura restrictiva antes de la eclosión del huevo, los machos l^{ts}/Y mueren y sólo las hembras eclosionan. De forma similar, la homocigosis de un l^{ts} en un cromosoma $\hat{X}X$ hace que sólo aparezcan machos silvestres en muestras incubadas a la temperatura restrictiva.



Figura 15-28. Utilización de los cromosomas X-unidos ($\hat{X}X$) de *Drosophila* para facilitar la búsqueda de mutaciones ligadas al cromosoma X. Se emplean espermatozoides tratados con EMS para fecundar óvulos portadores del cromosoma X-unido o de un cromosoma Y. Como los cromosomas X de los machos tratados aparecen en hemicigosis en los machos descendientes, las mutaciones recesivas se manifestarán.

COROLARIO

El mutágeno EMS ha revolucionado la versatilidad genética de *Drosophila* al suministrar un método potente para obtener una amplia gama de mutantes puntuales.

Mejora genética por mutación

Además de emplearlas en la disección genética de los sistemas biológicos, los genetistas utilizan las mutaciones con otros fines. Vimos en el Capítulo 2 que una forma de mejorar una planta cultivable consiste en generar un híbrido y seleccionar después los recombinantes deseados entre sus descendientes. Esta aproximación aprovecha la variación genética natural entre diferentes variedades de la naturaleza. La Figura 15-29 muestra algunos



Figura 15-29. *Potentilla fruticosa* silvestre (centro) y algunas de sus variedades de interés en horticultura, dispuestas en círculo. Todos los novedosos y atractivos cambios de forma, color, patrón de coloración y tamaño surgieron como mutaciones que fueron luego seleccionadas y cruzadas por los horticultores. La mayoría de las plantas con flores de nuestros parques y jardines, y la mayoría de las que empleamos hoy día como alimentos, han sido generadas por el mismo procedimiento, empezando con mutaciones espontáneas o inducidas. (Anthony Griffiths.)

resultados de tal procedimiento de mejora. Otra forma de generar variabilidad seleccionable es el tratamiento con un mutágeno. En este caso, se incrementa la variabilidad mediante intervención humana.

Pueden emplearse varios procedimientos. Uno consiste en mutagenizar el polen y usarlo luego para la polinización. Las mutaciones dominantes se manifestarán en la siguiente generación y las recesivas en sucesivas generaciones de autofecundación. Alternativamente, pueden mutagenizarse semillas. Una célula del embrión encerrado en la semilla puede transformarse en mutante, y posteriormente puede contribuir al tejido germinal o al somático. Si la mutación afecta al tejido somático, cualquier mutación dominante se pondrá de manifiesto en la planta desarrollada a partir de esa semilla, pero ese será el fin del trayecto de esa mutación. Las mutaciones germinales se manifestarán en generaciones posteriores, pudiendo entonces seleccionarse las que resulten de interés. La Figura 15-30 resume el uso de las mutaciones en mejora vegetal.

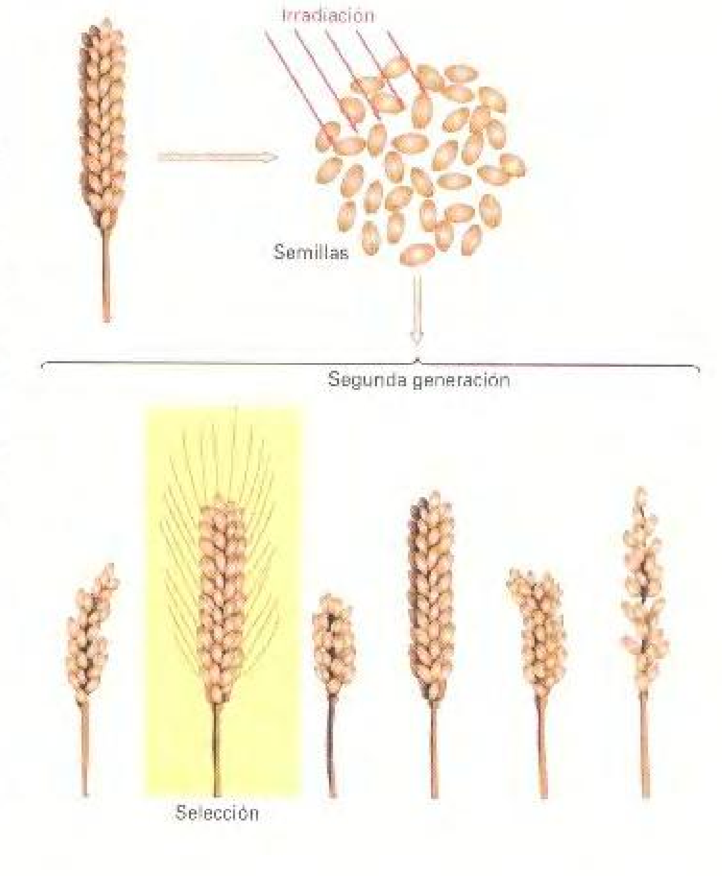


Figura 15-30. Mejora genética por mutación de plantas cultivables. (De Bjorn Sigurbjornsson, «Induced Mutations in Plants». Copyright © 1970, de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

RESUMEN

Los genes pueden mutar en células somáticas o germinales. Dentro de estas dos amplias categorías, hay varios tipos de mutaciones, incluyendo las morfológicas, letales, condicionales, bioquímicas y de resistencia.

Las mutaciones se utilizan para estudiar el propio proceso de mutación o como herramientas para la disección genética de las funciones biológicas. Para realizar estos estudios es necesario, sin embargo, disponer de un sistema de detección fenotípica de los alelos mutantes. En los organismos diploides, las mutaciones dominantes se detectan con facilidad. Pero la detección de mutaciones recesivas requiere el empleo de genotipos especiales: de otra forma, tales mutaciones podrían no manifestarse nunca en el fenotipo. Por este motivo, los sistemas de detección son mucho más directos en los haploides, en los que no se da el problema de la dominancia.

Los sucesos mutacionales ocurren al azar a lo largo del tiempo, y en cualquier célula. Así pues, el tamaño de un clon mutante depende de la fase del desarrollo en la que se produjo la mutación.

Con frecuencia, el resultado de las mutaciones es la pérdida de la función normal del alelo correspondiente, bien de forma completa (mutaciones nulas) o bien de forma parcial (mutaciones rezumantes). Las mutaciones de pérdida de función son normalmente recesivas, lo cual puede demostrarse estudiando heterocigotos, en los que el alelo silvestre aporta actividad suficiente para que aparezca el fenotipo normal. Las mutaciones de ganancia de función son normalmente dominantes.

Las mutaciones somáticas de oncogenes son la causa principal del cáncer. Algunos compuestos químicos del medio y la radiación influyen en la tasa de mutación de los genes cancerígenos.

Como las mutaciones espontáneas son muy raras, los genetistas utilizan sistemas selectivos, mutágenos, o ambos, para obtener mutantes. Los sistemas selectivos discriminan automáticamente entre los estados mutante y no mutante. Los mutágenos son valiosos no sólo para estudiar los mecanismos de mutación, sino para inducir mutaciones de uso en otros estudios genéticos. Los mutágenos se emplean además con frecuencia en mejora genética vegetal.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, relacionando entre sí tantos de los siguientes términos como le sea posible. Observe que los conceptos no están en ningún orden concreto.

mutación / alelo / reversión / silvestre / recesivo / somática / mutágeno / germinal / disección genética / descendientes

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

Algunas mutaciones recesivas afectan al color, la textura o la forma del grano de maíz. A estos alelos recesivos los denominaremos, en general, como *m*. Tales mutaciones se detectan con facilidad cruzando una planta masculina m^+/m^+ con una planta femenina *m*/*m*. Cualquier mutación nueva se detecta observando a ojo muchas semillas, en otras palabras, millones de granos o miles de mazorcas. Encontrar una semilla de fenotipo recesivo significa que uno de los genes de la planta masculina sufrió la mutación. Cuando los genetistas del maíz siembran semillas de fenotipo mutante y autofecundan la planta resultante, observan uno de los dos resultados siguientes:

1. Si la mutación era espontánea, los descendientes suelen ser todos mutantes.
2. Si la mutación se produjo tras tratamiento del polen con un mutágeno, los descendientes de la autofecundación suelen ser $\frac{3}{4}$ silvestres y $\frac{1}{4}$ mutante.

Ofrezca una explicación de estos diferentes resultados.

♦ Solución ♦

Como siempre, plantear los resultados de una forma ligeramente distinta nos ofrece pistas de lo que está pasando. La diferencia entre los dos resultados sugiere alguna diferencia entre mutaciones espontáneas e inducidas. En el primer caso, obtenemos individuos que deben ser de genotipo *m*/*m*, ya que se comportan como una variedad pura en cuanto al fenotipo mutante. En el segundo, obtenemos individuos que, de acuerdo con la proporción fenotípica 3:1 de su autofecundación, deben ser de genotipo m^+/m. Ciertamente, esta última conclusión no concuerda con la observación del grano de fenotipo mutante. Ésta es la paradoja. ¿Cómo es posible que de una semilla que manifiesta un fenotipo mutante recesivo surja una planta que genera los descendientes esperados de un heterocigoto?

El experimentador debe tener siempre en cuenta las peculiaridades del organismo con el que está trabajando. ¿Qué sabemos del maíz que pueda ser de interés en esta situación? La explicación concierne a hechos mutacionales que afectan de alguna forma a los granos de polen en las anteras de la planta. Recuerde del Capítulo 3 que un grano de polen maduro del maíz no es simplemente una célula con un único núcleo haploide, sino que incluye tres componentes importantes: un tubo polínico con un núcleo haploide y otros dos núcleos haploides que actúan como gametos masculinos. Uno de estos últimos se fusiona con un núcleo femenino para formar el cigoto y el otro se une con dos núcleos femeninos para generar el endospermo triploide. Cuando se tratan granos de polen maduros con un mutágeno, es probable que sólo uno de sus núcleos mute en alguna célula: las únicas mutaciones que podremos detectar son las que afecten al endospermo, ya que éste constituye la mayor parte del grano maduro. Ésta es la solución del problema, pero escribamos los genotipos implicados: el endospermo será *m*/*m*/*m*, y el embrión m^+/m. De ahí que la autofecundación produzca una proporción 3:1.

¿Qué hay de las mutaciones espontáneas? Un gen puede mutar en cualquier momento. El período de tiempo que transcurre entre las divisiones que producen los tres núcleos de una célula madura de polen y la fecundación es muy corto. Cualquier gen es mucho más probable que haya mutado en el período de tiempo relativamente mucho más largo que precede a la formación del polen maduro, posiblemente incluso mucho tiempo antes, en un tejido todavía somático. Si el gen muta realmente a *m* en ese período anterior, las divisiones de las células del polen producirán tres núcleos de genotipo *m*. Cuando se produzca la fusión con un gameto de la planta femenina *m*/*m*, se generará un endospermo *m*/*m*/*m* y un embrión *m*/*m*.

En resumen, hemos empleado conceptos tomados de nuestro examen de la diferencia entre mutación germinal y somática y de los sistemas de detección de mutantes (todo ello en este capítulo); de capítulos anteriores, hemos recurrido a nuestros conocimientos sobre relaciones de dominancia, genética mendeliana, mitosis y meiosis, y los ciclos de vida de los organismos.

PROBLEMAS RESUELTOS

1. Una determinada especie vegetal presenta normalmente el pigmento morado antocianina disperso por toda la planta. Ello hace que las partes verdes de la planta aparezcan de color marrón (mezcla de verde y morado) y que las partes de las flores carentes de clorofila (pétalos, ovarios y anteras) sean de un color morado intenso. El alelo *A* es esencial para la producción de antocianina, y, en homocigosis, el alelo recesivo *a* provoca falta de antocianina. Aparece un nuevo alelo, designado a^u, que es inestable. El alelo a^u revierte a *A* con una frecuencia miles de veces superior a la observada para el alelo normal (estable) *a*.

a. ¿Qué fenotipo esperaría en plantas de genotipo (1) a^u/a^u; (2) a^u/a; (3) A/a^u?

b. ¿Cómo confirmaría que las reversiones son verdaderas mutaciones?

♦ Solución ♦

a. (1) Hemos visto que las mutaciones suelen ser poco frecuentes; en el transcurso normal de los acontecimientos, rara vez se observan a menos que se busquen concienzudamente. Sin embargo, un alelo que revierte con tanta frecuencia como a^u es muy probable que manifieste el fenómeno de reversión numerosas veces, si se dispone de un sistema adecuado de detección. En una planta con miles de millones de células somáticas, muchas de ellas sufrirán reversión con toda seguridad en algún momento del desarrollo. A medida que éste avance, cada célula revertiente dará lugar a un clon de células revertientes que deben ser visibles como un sector de color marrón o morado. Por tanto, una planta

de genotipo a^u/a^u debería producir flores blancas con manchas moradas de tamaño variable, y tejidos fotosintéticos que serían mayoritariamente verdes, con manchas marrones.

(2) Cada sector de la planta es un clon derivado de una única célula que posee un alelo a^u, capaz de revertir a *A*. El alelo a^u se espera que sea dominante sobre *a*, porque *a* es en esencia inactivo y no impediría que a^u revertiese. Por ello, las plantas a^u/a tendrán el mismo aspecto que las plantas a^u/a^u, aunque con menos manchas moradas o marrones porque la probabilidad de reversión se reduce a la mitad.

(3) Como *A* produce pigmento en todas las células, el fenotipo de las plantas A/a^u será indistinguible del de las plantas *A/A*. Aunque a^u revierta, la reversión no se manifestará —carecemos de un sistema de detección. Estas plantas serán por completo de color morado/marrón.

b. ¿Cómo podemos demostrar que un sector pigmentado se debe realmente a una mutación? La clave está en que los genes son unidades hereditarias y los alelos mutantes deben transmitirse a las siguientes generaciones de células o individuos. ¿Cómo podríamos detectar la transmisión de los alelos revertientes *A* a células o individuos descendientes? Si pudiéramos raspar unas cuantas células de una mancha y hacer que desarrollen una planta, y esa planta resulta ser morada, entonces la hipótesis de la reversión habría sido probada. Se dispone de las técnicas necesarias para realizar ese experimento, pero ¿existe otra forma de demostrarlo? Si aparece un sector revertiente en la flor, es probable que el tejido germinal (anteras y ovarios) esté incluido en algunos casos en ese sector. Por tanto, podríamos recoger polen de una planta como esa y usarlo para polinizar otra planta de genotipo *a/a*. Si hubiera algún grano de polen de genotipo *A*, la planta generada de ese grano de polen debería ser *A/a* y ser toda ella de color morado-marrón. Así pues, encontrar algún descendiente de ese fenotipo probaría que la reversión es una mutación verdadera, ya que el alelo *A* no puede haber surgido de ningún otro sitio.

Se realiza un trabajo de mutación con el locus *tryp4* de levadura. La mutación *tryp4* provoca auxotrofía para el aminoácido triptófano. Se sabe que un alelo mutante *tryp4*, denominado *tryp4-1*, puede revertir; los experimentos intentan medir la frecuencia de reversión en una población de células haploides. Se cultivó una estirpe de sexo α y de genotipo *tryp4-1* y se sembraron 10 millones de células de ese cultivo en placas de medio sin triptófano; se obtuvieron 120 colonias. Se comprobó el genotipo de estas colonias mediante cruzamiento con un cultivo silvestre de células de sexo *a*. Los resultados de estos cruzamientos revelaron que entre las colonias prototrofas había dos tipos: las dos terceras partes eran de tipo 1 y una tercera parte de tipo 2:

Tipo 1α × silvestre *a* ⟶ todos los descendientes protótrofos para triptófano

Tipo 2α × silvestre *a* ⟶
$\frac{3}{4}$ de los descendientes protótrofos para triptófano
$\frac{1}{4}$ de los descendientes auxótrofos para triptófano

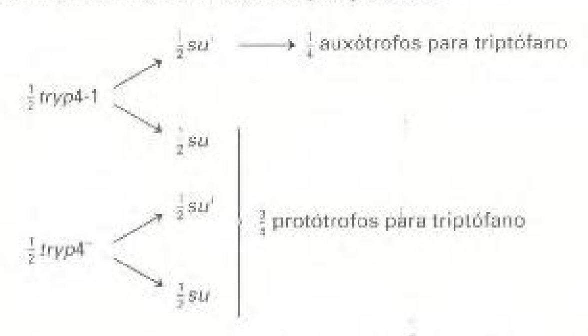
a. Proponga una explicación genética de la aparición de los dos tipos.

b. Calcule la frecuencia de aparición de revertientes.

♦ Solución ♦

a. Cuando sembramos en medio sin triptófano estamos seleccionando revertientes $tryp4^+$, que no requieren triptófano para crecer. Cuando tales revertientes se cruzan con el silvestre ($tryp4^+$) toda la descendencia debe ser protótrofa para el triptófano. Éste es el comportamiento que presentan las colonias de tipo 1, así que esas colonias representan auténticos revertientes.

¿Qué podemos decir de las colonias de tipo 2? El hecho de que algunos de sus descendientes sean auxótrofos para el triptófano indica que la mutación *tryp4-1* no ha sufrido una auténtica reversión. Más bien parece que el requerimiento para el triptófano ha sido enmascarado o suprimido. Ya hemos visto varios ejemplos de supresión de un alelo mutante por una nueva mutación en un locus distinto. Incluso si no recordásemos esos ejemplos, la proporción 3:1 en un organismo haploide sugiere que hay dos loci independientes implicados. Designemos como *su* la mutación supresora, y su^+ su alelo silvestre inactivo. Las colonias tipo 2 serían *trp4-1* ; *su*, y las silvestres $trp4^+$; su^+. Un cruzamiento entre estas dos estirpes produce:



(Observe que su no tiene efecto alguno sobre el alelo $tryp4^+$).

b. Se nos dice que dos tercios de las colonias son de tipo 1, o verdaderos revertientes. Por tanto, hay $120 \times \frac{2}{3} = 80$ revertientes de un total de 10^7, lo cual equivale a una frecuencia de revertientes de 8×10^{-6} células.

PROBLEMAS

Una especie determinada de plantas produce normalmente flores de pétalos azules. Plantas portadoras de la mutación *w* producen pétalos blancos. En una planta de genotipo *w/w*, uno de los alelos *w* sufre una reversión durante el desarrollo

de un pétalo. ¿Qué resultado visible se producirá en el pétalo correspondiente?

2. *Penicillium* (un hongo filamentoso de interés comercial) puede sintetizar normalmente su propia leucina (un aminoácido). ¿Cómo seleccionaría mutantes auxótrofos para leucina (que no puedan sintetizar su propia leucina)? (**Nota:** como otros muchos hongos filamentosos, *Penicillium* produce un elevado número de esporas asexuales).

3. ¿Cómo seleccionaría revertientes del alelo *pro-1* de levadura? Este alelo provoca incapacidad para sintetizar el aminoácido prolina, que sí puede ser sintetizado por el silvestre y es necesario para el crecimiento.

4. ¿Cómo utilizaría la técnica de réplica en placa para buscar mutantes de levadura auxótrofos para arginina?

5. Utilizando la técnica de enriquecimiento por filtración, hace sus filtraciones en medio mínimo y la siembra final en un medio completo que contiene todos los compuestos nutritivos conocidos. ¿Cómo averiguaría qué nutriente específico es requerido por un mutante? Después de replicarlo en placas con cada uno de los suplementos nutritivos conocidos, todavía le resulta imposible identificar el requerimiento nutritivo de cierto nuevo mutante de levadura. ¿Cuál o cuáles podrían ser los motivos?

6. Se inicia un experimento para medir la tasa de reversión de un alelo mutante *ad-3* en células haploides de levadura. Se inoculan 100 tubos que contienen medio líquido enriquecido con adenina con un número pequeño de células mutantes y se incuban hasta conseguir 10^6 células por tubo. Entonces se siembra por separado el contenido de cada tubo en una placa de medio sólido sin adenina. Al día siguiente, se observan las placas y se encuentran colonias en 63 de ellas. Calcule la tasa de reversión de este alelo por cada división celular.

7. Suponga que desea averiguar si la cafeína induce mutaciones en organismos superiores. Explique cómo lo haría (incluya controles).

8. En el maíz, dos alelos de un gen determinan presencia (*Wx*) o ausencia (*wx*) de amilosa en el almidón celular. Las células portadoras del alelo *Wx* se tiñen de azul con yodo; las que sólo tienen el alelo *wx* se tiñen de rojo. Diseñe un sistema para estudiar la frecuencia de la mutación (poco frecuente) $Wx \rightarrow wx$, sin tener que utilizar varias hectáreas de tierra. (**Una pista**: podría empezar pensando en un tipo celular que sea fácil de estudiar.)

9. Suponga que cruza un ratón macho de una línea homocigótica silvestre con varias hembras vírgenes homocigóticas para un alelo responsable de que el pelaje sea de color negro. La F_1 consta de 38 ratones silvestres y 5 ratones negros. Ambos sexos están igualmente representados en ambas clases fenotípicas ¿Cómo explicaría este resultado?

10. Un hombre que lleva varios años como empleado de una central nuclear tiene un hijo hemofílico, el primer caso en un extenso árbol genealógico familiar tanto materno como paterno. Otro hombre, también empleado durante varios años en la misma central, tiene un hijo que sufre de enanismo acondroplásico, también el primer caso conocido en ambas ramas familiares. Los dos hombres demandan a su empresario por daños y perjuicios. Como genetista, es llamado al juicio para ofrecer su testimonio de experto. ¿Qué diría en cada caso? (**Nota:** la hemofilia se debe a un alelo recesivo ligado al cromosoma X; la acondroplasia es autosómica dominante.)

11. En un gran hospital de maternidad de Copenhague se han registrado 94 075 nacimientos. Diez de los recién nacidos son enanos acondroplásicos (la acondroplasia es una condición autosómica dominante y de penetrancia completa). Sólo dos de los afectados tenían un progenitor que sufría la misma enfermedad. ¿Cuál es la frecuencia de mutación a acondroplasia en los gametos? ¿Tiene que tener en cuenta la tasa de reversión en este problema? Explíquelo.

12. Uno de los cometidos de la Comisión para las víctimas de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki era el de evaluar las consecuencias genéticas de las explosiones. Uno de los primeros parámetros que estudiaron fue la proporción de sexos entre los descendientes de los supervivientes. ¿Por qué cree que lo hicieron?

13. Muchos organismos ofrecen ejemplos de alelos recesivos inestables que revierten al alelo silvestre con mucha frecuencia. Distintos alelos inestables suelen revertir de forma diferente. Un gen del maíz que produce un pigmento rojizo en los granos (*C*) tiene varios alelos nulos inestables. El alelo inestable c^{m1} revierte en fases tardías del desarrollo del grano y a una tasa muy elevada. Otro alelo inestable, c^{m2}, lo hace en fases más tempranas del desarrollo del grano y a una tasa menor. Suponiendo que la falta de pigmento hace que las células aparezcan de color amarillo, ¿qué fenotipo se esperan en plantas de los siguientes genotipos?

a. C/c^{m1} **e.** c^{m1}/c (*c* es un alelo mutante estable)
b. C/c^{m2} **f.** c^{m2}/c
c. c^{m1}/c^{m1} **g.** c^{m1}/c^{m2}
d. c^{m2}/c^{m2}

14. Una estirpe haploide de *Aspergillus nidulans* lleva la mutación *met-8*, que provoca auxotrofía para metionina. [illegible] millones de esporas asexuales de esa estirpe se siembran en placas de medio mínimo y aparecen dos colonias prototrofas. Las dos colonias se cruzan por separado con las cepas distintas, apareciendo en cada caso los resultados que se muestran en la tabla adjunta, en la que met^+ indica que no se requiere metionina para crecer y met^- que se requiere metionina para crecer.

Colonia	Cruzamiento con una estirpe silvestre	Cruzamiento con una estirpe portadora de la mutación original *met-8*
protótrofa 1	Todos met^+	$\frac{1}{2}met^+$ $\frac{1}{2}met^-$
protótrofa 2	$\frac{3}{4}met^+$ $\frac{1}{4}met^-$	$\frac{1}{2}met^+$ $\frac{1}{2}met^-$

a. Explique el origen de las dos colonias protótrofas originales.

b. Empleando símbolos genéticos claramente definidos, explique los resultados de los cuatro cruzamientos.

El problema paso a paso

Antes de tratar de resolver este problema, considere las siguientes cuestiones relacionadas con el sistema experimental.

1. Dibuje un diagrama explicativo que indique cómo se hizo el experimento. Muestre tubos de ensayo, placas de Petri, etc.

2. Defina todos los términos genéticos del problema.

3. Muchos problemas muestran un número al lado del símbolo de la mutación de auxotrofía, el número 8 a continuación de *met* en este caso. ¿Qué significa ese número? ¿Es necesario saberlo para resolver el problema?

4. ¿Cuántos cruzamientos se realizaron en realidad? ¿Cuáles fueron?

5. Represente los cruzamientos utilizando símbolos genéticos

6. ¿Trata el problema de una mutación somática o germinal?

7. ¿Se trata de una mutación directa o inversa?

8. ¿Por qué se encontró un número tan pequeño (dos) de colonias protótrofas en las placas de Petri?

9. ¿Por qué no crecieron los varios millones de esporas asexuales?

10. ¿Cree que algunas de esas esporas que no crecieron eran mutantes? ¿Estaban muertas?

11. ¿Cree que el silvestre utilizado en los cruzamientos era protótrofo o auxótrofo? Explíquelo.

12. Si tuviera los dos protótrofos de las placas y la estirpe silvestre en tres tubos de cultivo diferentes, ¿podría distinguirlos a simple vista?

13. ¿Cómo cree que se obtuvo el mutante original *met-8*? (Inclúyalo mediante un diagrama sencillo. Nota: *Aspergillus* es un hongo filamentoso)

14. Vimos en el Capítulo 6 que *Aspergillus* es un organismo adecuado para estudiar recombinación mitótica y haploidización. ¿Piensa que tales procesos son de aplicación a este problema? ¿Pueden descartarse como posibles explicaciones de los resultados obtenidos?

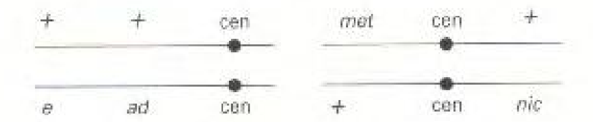
15. ¿Qué descendientes esperaría del cruzamiento entre *met-8* y el silvestre? ¿Y del cruzamiento *met-8* × *met-8*? ¿Y del cruzamiento silvestre × silvestre?

16. ¿Cree que se trata del análisis aleatorio de la descendencia meiótica o de un análisis de tétradas?

17. Dibuje un diagrama sencillo que muestre el ciclo de vida de un organismo haploide, señalando en qué momento del ciclo ocurre la meiosis.

18. Considere la proporción $\frac{3}{4}:\frac{1}{4}$. En los haploides, los cruzamientos que implican heterocigosis para un gen suelen dar proporciones en «mitades». ¿Cómo puede extenderse esta idea a la obtención de proporciones en «cuartos»?

15. Una estirpe diploide de levadura era heterocigótica para varios genes, como se muestra a continuación:



El alelo recesivo *e* hace que la célula sea alargada, en forma de huevo, en vez de redondeada como las células silvestres, y el alelo recesivo *ad* (auxotrofía para adenina) provoca la acumulación en el medio de un pigmento de color rojo, en condiciones de limitación de adenina (color blanco en el caso del alelo silvestre). Los alelos *met* y *nic* son alelos recesivos que provocan dos auxotrofías distintas y que se emplean como «marcadores selectivos», que obligan a las células a permanecer en estado diploide, situación en la que pueden crecer en medio mínimo. «Cen» representa el centrómero. El cultivo original era blanco, crecía bien en medio mínimo y, en condiciones de limitación de adenina, no producía pigmento rojo. Al irradiar las células y sembrarlas en medio mínimo con cantidades limitadas de adenina se encontraron colonias de distintos fenotipos:

a. La mayoría de las colonias eran de color blanco.

b. Varias colonias diploides eran de color rojo. Células de estas colonias se observaron al microscopio.

(1) Las células de la mayoría de las colonias eran redondeadas.

(2) Las células de algunas colonias eran alargadas.

c. En las placas había muchas células que no dieron lugar a colonias. Algunas se transfirieron a medio completo con extracto de levadura (que incluye todos los nutrientes necesarios).

(1) Algunas formaron colonias.

(2) Otras no.

¿Cuál es la explicación más probable del origen de cada uno de estos cinco tipos de colonias?

16. Se han mutagenizado células de una estirpe haploide de *Neurospora* con EMS. Un número elevado de estas células se sembraron en medio completo (con todos los nutrientes posibles) y se dejaron crecer a 25 °C. Las colonias aparecidas se probaron en medio mínimo y completo, tanto a 25 °C como a 37 °C. Se observaron varios fenotipos mutantes, que se muestran en el dibujo adjunto. Los círculos grandes significan crecimiento abundante, los símbolos a modo de tela de araña representan escaso crecimiento, y un espacio en blanco significa ausencia de crecimiento. ¿Cómo clasificaría los tipos de mutantes representados por las estirpes 1 a 5?

Estirpe	Mínimo		Completo	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
Mutante 1			○	○
Mutante 2	○		○	
Mutante 3	✳	✳	○	○
Mutante 4	○	✳	○	✳
Mutante 5	○		○	○
Silvestre (control)	○	○	○	○

17. **a.** Ha aislado tres cepas mutantes de un hongo haploide que requieren triptófano para crecer. Las cruza (por parejas) y comprueba la capacidad de 1000 esporas de cada cruzamiento para crecer en ausencia de triptófano.

Cruzamiento	Parentales	Trp^+/1000
1	A × B	135
2	A × C	179
3	B × C	50

¿Qué concluye de estos resultados?

b. Cultiva cinco de las esporas auxótrofas para triptófano procedentes del cruzamiento 2 (las marca como «2-1», «2-2», etc.) y cruza cada uno de los cultivos con el mutante B original. De nuevo, comprueba la capacidad de los descendientes de crecer en ausencia de triptófano.

Cruzamiento	Parentales	Trp^+/1000
4	2-1 × B	132
5	2-2 × B	13
6	2-3 × B	53
7	2-4 × B	137
8	2-5 × B	47

¿Qué puede concluir de cada una de las estirpes 2-1, 2-2, etc.? Su explicación debe incluir el fenotipo de cada estirpe y cómo se originó.

(Problema 17, de Rosie Redfield.)

18. Para comprender las bases genéticas de la locomoción del nematodo diploide *Caenorhabditis elegans*, se obtuvo una colección de mutaciones recesivas, todas las cuales hacían que el gusano se moviera ineficazmente y a tirones bruscos en vez de mostrar el normal deslizamiento suave y continuo. Probablemente, tales mutaciones habrían afectado al sistema nervioso o al sistema muscular. Se cruzaron entre sí doce mutantes homocigóticos y se examinó la forma de desplazarse de los híbridos resultantes. Los resultados aparecen en la tabla adjunta, en la que «+» significa que el híbrido es de fenotipo silvestre (deslizamiento suave) y «t» significa que el híbrido de desplazaba a tirones bruscos e ineficaces

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	t	+	+	+	t	+	+	+	+	+	+
2		t	+	+	+	t	+	t	+	t	+
3			t	t	+	+	+	+	+	+	+
4				t	+	+	+	+	+	+	+
5					t	+	+	+	+	+	+
6						t	+	t	+	t	+
7							t	+	+	+	t
8								t	+	t	+
9									t	+	+
10										t	+
11											t
12											

a. Explique qué intención tenía esta serie de cruzamien entre los distintos mutantes

b. ¿Cuántos genes implicados en la locomoción han identificados, y qué mutaciones afectan a cada gen? N bre los genes con los símbolos que desee.

c. Como ejemplo ilustrativo, y empleando los símbolos e gidos en el apartado anterior, indique los genotipos releva de los mutantes 1, 2 y 5, y de los híbridos 1/5 y 1/2, y exp por qué estos dos híbridos se comportan de forma dist

19. **Nota:** este problema hace referencia al código gen (véase la Fig. 10-27). La síntesis de un pigmento púrpur maíz está controlada por dos genes que actúan sucesivar te, existiendo productos intermedios incoloros («blanc

$$\text{blanco 1} \xrightarrow{\text{gen } A} \text{blanco 2} \xrightarrow{\text{gen } B} \text{púrpura}$$

Se han identificado mutaciones sin sentido UAG tan el gen *A* como en el gen *B*, a las que podemos denor como a^n y b^n. Ambas provocan ausencia de la acti enzimática correspondiente y son recesivas frente alelos silvestres *A* y *B*.

Se conoce también un supresor de la citada mutació sentido: se trata de una mutación en una de las copias gen duplicado de un tRNA. El sitio mutado afecta al codón, de forma que el supresor provoca la inserció aminoácido triptófano en el codón fin de mensaje U permitiendo así que la maquinaria de síntesis de pro complete la traducción. El resultado es la reaparició fenotipo silvestre. Representaremos al alelo supresor T^S y al alelo silvestre como T^+. Ni T^S ni T^+ producen

detectable alguno sobre los alelos silvestres de A y B, o sobre alguna otra característica fenotípica.

a. ¿Esperaría que T^S fuera dominante sobre T^+, o no? Explique su respuesta.

b. Autofecundamos una cepa trihíbrida A/a^v ; B/b^u ; T^S/T^-. Si ninguno de los genes están ligados, ¿qué proporción fenotípica esperaría entre los descendientes? Explique su respuesta con todo detalle. (Asuma que la ausencia del pigmento púrpura da lugar a una ligera coloración que podemos denominar blanca).

20. Describa con detalle los pasos que seguiría para identificar el locus cromosómico de una nueva mutación recesiva que acaba de encontrar en el tomate. Indique qué cruzamientos realizaría, qué líneas emplearía en ellos, cómo obtendría estas líneas, cuánto terreno o espacio de invernadero necesitaría, cuánto tardaría, etc. (Puede hacer uso del mapa genético del tomate que aparece en la Fig. 5-15).

21. Se ha obtenido una colonia protótrofa a partir de una estirpe de *Neurospora* auxótrofa para arginina. Se realiza un cruzamiento entre el revertiente y la estirpe silvestre. ¿Qué proporción de protótrofos se encontrará entre los descendientes de este cruzamiento, si

a. la reversión ha consistido exactamente en el cambio contrario al que dio lugar al alelo mutante original arg^-?

b. el fenotipo revertiente se debió a una mutación en otro gen situado en otro cromosoma, suprimiendo la nueva mutación a arg^-?

c. se trata de una mutación supresora ocurrida en otro gen situado en el mismo cromosoma que el locus arg^-, a 10 unidades de mapa de dicho locus?

22. Cierto hongo haploide es normalmente de color rojo, debido a la acumulación de un pigmento carotenoide. Se han obtenido mutantes de distintos colores, debidos a la presencia de diferentes pigmentos: naranja (n^-), rosa (r^-), blanco (b^-), amarillo (a^-) y marfil (m^-). Cada fenotipo se hereda como si dependiera de un solo gen. Para determinar qué significan estas mutaciones, se han construido todos los mutantes dobles posibles, con el resultado siguiente:

	(r^-)	(b^-)	(a^-)	(m^-)
(n^-)	rosa	blanco	amarillo	marfil
(r^-)	—	blanco	rosa	rosa
(b^-)		—	blanco	blanco
(a^-)			—	amarillo

Interprete esta tabla como sigue, empleando la primera entrada como ejemplo: el mutante doble $n^- \cdot r^-$ es de fenotipo rosa.

a. ¿Qué significan los resultados de la tabla? Explíquelo con detalle.

b. ¿Qué fenotipos aparecerían si los mutantes se tomaran por parejas para formar heterocariontes en todas las combinaciones posibles?

c. ¿Qué proporciones fenotípicas aparecerían entre los descendientes de un cruzamiento entre el doble mutante $n^- \cdot r^-$ y el silvestre, si ambos loci están ligados, a una distancia de 16 unidades de mapa?

23. Tras mutagenizar una estirpe de *Aspergillus* con rayos X, y empleando el método de la réplica en placa, se han aislado dos estirpes mutantes auxótrofas para triptófano (mutantes A y B). Para obtener revertientes, numerosas células de cada una de las estirpes auxótrofas se han sembrado en placas de medio sin triptófano. No se obtiene ningún revertiente del mutante A, pero sí uno del mutante B. Este revertiente se cruza con una cepa silvestre. ¿Qué proporción de los descendientes de este cruzamiento serán protótofos, si

a. la reversión ha consistido exactamente en el cambio contrario al que dio lugar al alelo mutante original trp^-?

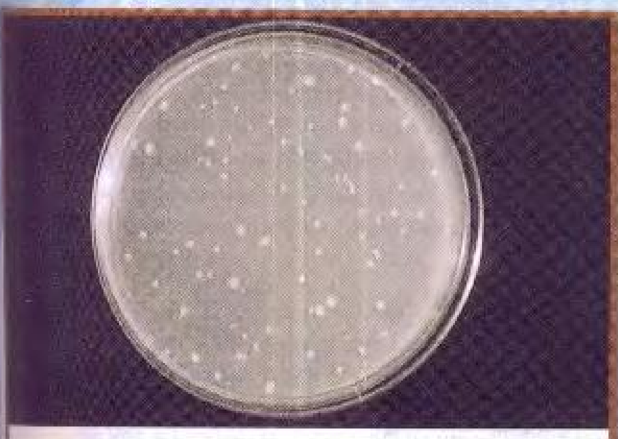
b. el fenotipo revertiente se debió a una mutación en otro gen situado en otro cromosoma, suprimiendo la nueva mutación a trp^-?

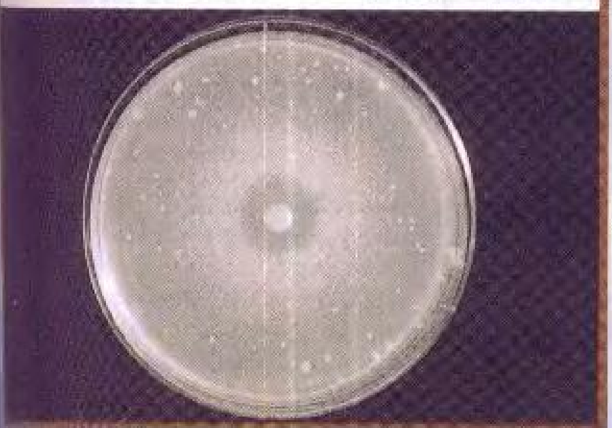
c. se trata de una mutación supresora ocurrida en otro gen situado en el mismo cromosoma que el locus trp^-, a 24 unidades de mapa de dicho locus?

d. Comente la posible naturaleza del mutante A.

16

MECANISMOS DE LA MUTACIÓN GÉNICA





st de *Salmonella* (test de Ames) para la detección e mutágenos.
ba: placa de Petri sembrada con alrededor de 10^9 bacterias apaces de sintetizar histidina (el pequeño número de colonias ibles corresponde a revertientes espontáneos). *Abajo*: placa de tri con un disco impregnado de un mutágeno. Éste produce un n número de revertientes capaces de sintetizar histidina; los rtientes aparecen como un anillo de colonias alrededor del disco. *(...Ames, SRI International, Menlo Park, California.)*

Ideas fundamentales

Las mutaciones pueden producirse de forma espontánea mediante varios mecanismos diferentes, que incluyen a los errores en la replicación y las lesiones fortuitas en el DNA.

Los mutágenos son agentes que aumentan la frecuencia de mutagénesis, generalmente alterando el DNA.

Los compuestos potencialmente mutágenos y carcinógenos se pueden detectar fácilmente mediante pruebas de mutagénesis con sistemas bacterianos.

Los sistemas biológicos de reparación eliminan del DNA muchas alteraciones potencialmente mutágenas.

Las células que carecen de ciertos sistemas de reparación tienen frecuencias de mutación más altas de lo normal.

Este capítulo describe los numerosos tipos de procesos moleculares que dan lugar a los alelos mutantes que se discutieron en el capítulo anterior. Dichos procesos son relevantes no sólo en lo que concierne a la Genética experimental, sino que también tienen una implicación directa en la salud humana.

Base molecular de las mutaciones génicas

Las mutaciones génicas pueden producirse de forma espontánea o pueden inducirse. Las **mutaciones espontáneas** se dan de forma natural y se producen en todas las células. Las **mutaciones inducidas** se producen cuando un organismo es expuesto a un agente mutagénico, o mutágeno; estas mutaciones ocurren típicamente con mucha mayor frecuencia que las espontáneas.

La comprensión de los mecanismos de la mutación génica requiere la realización de análisis a nivel de las moléculas de DNA y de proteína. En capítulos anteriores se han descrito modelos para las estructuras del DNA y de las proteínas, y se ha discutido la naturaleza de las mutaciones que alteran estas estructuras (véase, p. ej., el Cuadro 15-1).

Se pueden emplear las técnicas de la Genética molecular para la determinación de la secuencia de grandes tramos de DNA, así como de los cambios en la secuencia debidos a las mutaciones. La secuenciación ha incrementado enormemente nuestro conocimiento sobre las rutas implicadas en la mutagénesis y ha ayudado incluso a desentrañar los misterios de los puntos calientes mutacionales (sitios genéticos con gran tendencia a sufrir mutaciones).

Gran parte del trabajo sobre la base molecular de la mutación se ha llevado a cabo en células individuales de bacterias y en sus virus. Sin embargo, también se han analizado muchas mutaciones causantes de enfermedades hereditarias en la especie humana, y revisaremos algunos de los hallazgos de estos estudios. Analizaremos también los mecanismos biológicos de reparación, ya que desempeñan una función fundamental en la mutagénesis, operando para disminuir las tasas finales de mutación observadas. Por ejemplo, en *Escherichia coli*, cuando todos los sistemas de reparación son operativos, las sustituciones de bases ocurren a tasas de 10^{-10} a 10^{-9} por par de bases, por célula y por generación. Como principio general, las sustituciones de bases se deben a la pertur- ción del emparejamiento normal entre las bases complementarias.

Mutaciones espontáneas

Se deben a distintas causas: errores en la replicación del DNA, lesiones espontáneas y elementos genéticos transponibles. Las primeras se tratan en esta sección; la tercera, en el Capítulo 2

Errores en la replicación del DNA

Un error en la replicación del DNA puede producirse cuando se forma un par de nucleótidos ilegítimo (digamos, A—C) durante la síntesis del DNA, que da lugar a la sustitución de una base por otra.

Cada una de las bases del DNA puede aparecer en una de varias formas, denominadas **tautómeros**, que son isómeros que difieren en las posiciones de sus átomos y en los enlaces que forman entre ellos. Estas formas están en equilibrio. La forma **ceto** de cada base es la que se encuentra normalmente en el DNA (Fig. 16-1), mientras que las formas **imino** y **enol** son raras. La capacidad del tautómero raro de una base para emparejarse erróneamente y producir una mutación durante la replicación del DNA fue puesta de manifiesto por primera vez por Watson y Crick, cuando propusieron su modelo de la estructura del DNA (Cap. 8). La Figura 16-2 presenta algunos posibles emparejamientos erróneos causados por el cambio de un tautómero a otro, que recibe la denominación de **cambio tautomérico**.

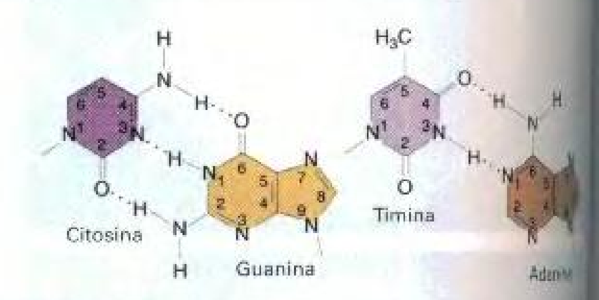


Figura 16-1. Emparejamientos entre las formas normales (ceto) de las

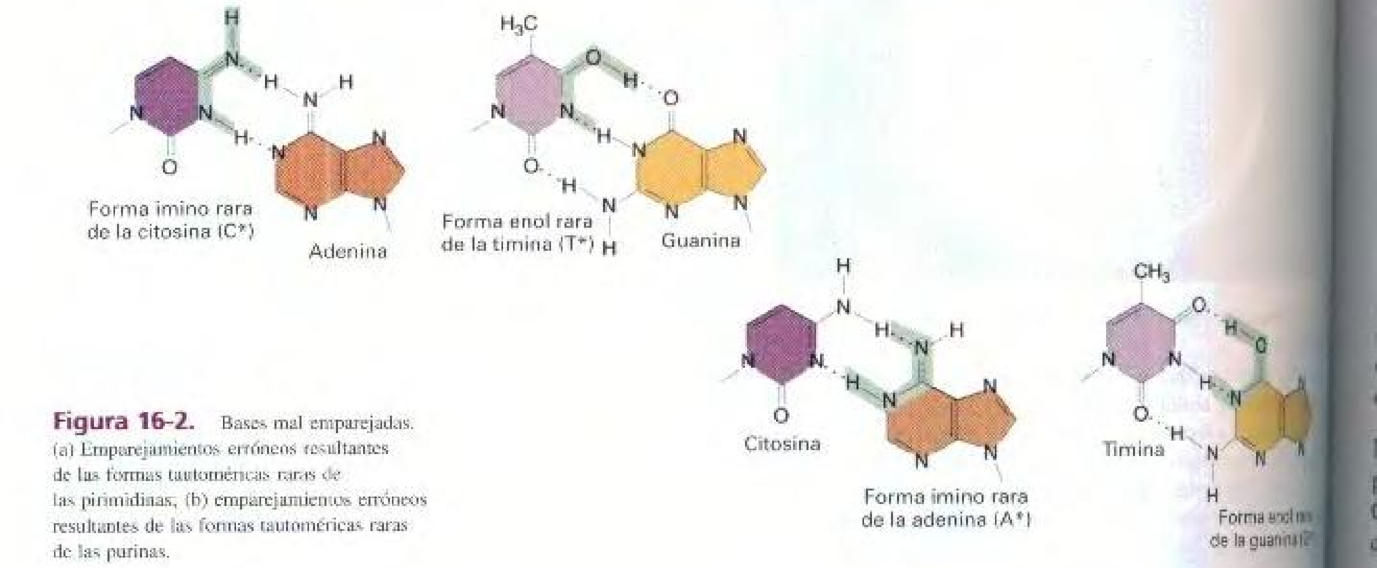


Figura 16-2. Bases mal emparejadas. (a) Emparejamientos erróneos resultantes de las formas tautoméricas raras de las pirimidinas; (b) emparejamientos erróneos resultantes de las formas tautoméricas raras de las purinas.

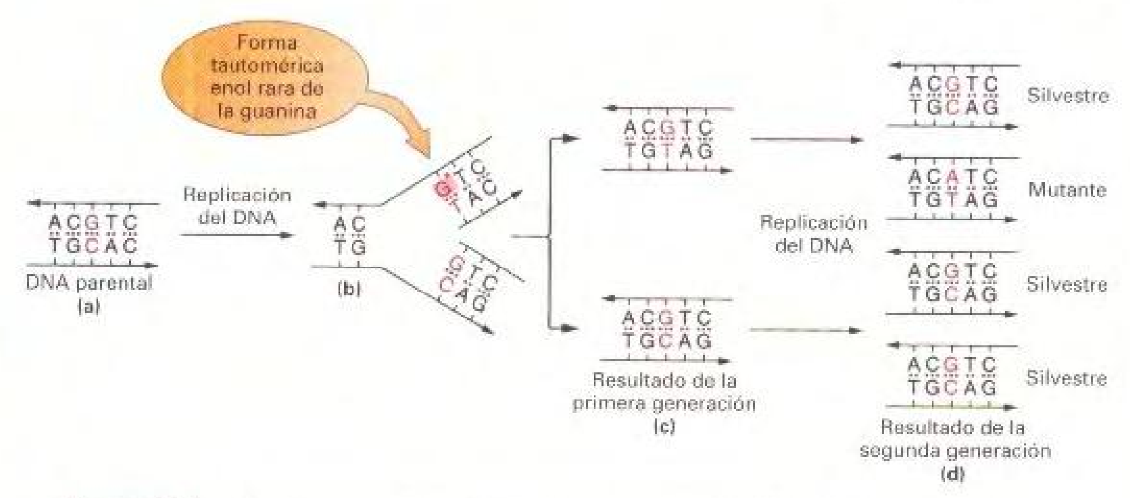


Figura 16-3. Mutación generada por cambios tautoméricos en las bases del DNA. (a) En el ejemplo que se representa en la figura, una guanina sufre un cambio tautomérico a su forma enol rara (G*) durante la replicación. (b) En su forma enol, empareja con la timina. (c y d) En la siguiente replicación, la guanina vuelve a su forma ceto más estable. La timina incorporada frente a la forma enol de la guanina (véase en b) dirige la incorporación de adenina en la siguiente replicación, mostrado en c y d. El resultado neto es una mutación GC → AT. Si una guanina sufre el cambio tautomérico de la forma ceto común a la forma rara enol en el momento de la incorporación (como nucleósido trifosfato, en lugar de en la cadena molde que se esquematiza), se incorporará frente a una timina de la cadena molde y causará una mutación AT → GC. (Tomado de E. J. Gardner y D. P. Snustad, *Principles of Genetics*, 5.ª ed. Copyright © 1984, John Wiley & Sons, New York.)

Los emparejamientos erróneos pueden ocurrir también cuando una de las bases se **ioniza**. Esto sucede con mayor frecuencia que los emparejamientos erróneos producidos por las formas imino o enol de las bases.

Transiciones. Todos los emparejamientos erróneos descritos hasta ahora dan lugar a **mutaciones por transición**, en las que una purina es sustituida por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina (Fig. 16-3). La polimerasa de DNA III bacteriana (Cap. 8) tiene una actividad correctora que reconoce tales emparejamientos erróneos y los escinde, reduciendo así enormemente las mutaciones observadas. Otro sistema de reparación (que se describe más adelante en este capítulo) corrige muchas de las bases mal emparejadas que escapan a la corrección por la función correctora de la polimerasa.

Transversiones. En las **mutaciones por transversión**, una pirimidina es sustituida por una purina o viceversa. Las transversiones no pueden generarse mediante los emparejamientos erróneos representados en la Figura 16-2. Con las bases del DNA en la orientación normal, la creación de una transversión por un error en la replicación requeriría el emparejamiento erróneo de una purina con una purina o de una pirimidina con una pirimidina en algún momento durante la síntesis del DNA. Aunque las dimensiones de la doble hélice del DNA desfavorecen energéticamente tales emparejamientos, sabemos ahora, por estudios de difracción de rayos X, que pueden formarse pares G—A, así como otros pares purina-purina.

Mutaciones de cambio de fase. Los errores en la replicación pueden conducir a **mutaciones de cambio de fase**. Recuerde del Capítulo 10 que tales mutaciones dan lugar a proteínas muy modificadas.

A mediados de los años sesenta, George Streisinger y sus colaboradores dedujeron las secuencias de nucleótidos localizadas alrededor de diferentes sitios de mutaciones de cambio de fase en el gen de la lisozima del fago T4. Descubrieron que estas mutaciones ocurrían a menudo en secuencias repetidas y propusieron un modelo que explicaba los cambios de fase durante la síntesis del DNA. En el modelo de Streisinger (Fig. 16-4), los cambios de fase surgen cuando los lazos en regiones de cadena sencilla se estabilizan mediante un «emparejamiento erróneo deslizado» entre secuencias repetidas.

En los años setenta, Jeffry Miller y sus colaboradores examinaron puntos calientes mutacionales en el gen *lacI* de *E. coli*. Como se mencionó con anterioridad, los puntos calientes son sitios de un gen que son mucho más mutables que otros. El trabajo con *lacI* demostró que ciertos puntos calientes son el resultado de secuencias repetidas, tal como predecía el modelo de Streisinger. La Figura 16-5 representa la distribución de mutaciones espontáneas en el gen *lacI*. Compare esta distribución con la que observó Benzer en los genes *rII* de T4 (véase la Fig. 9-26). Observe que predominan en ambos casos los sitios con uno o dos hechos mutacionales. En *lacI*, la causa de los puntos calientes es una secuencia de cuatro pares de bases repetida tres veces en tándem en el silvestre (por simplicidad, sólo se indica una de las dos cadenas del DNA).

—GTCTGG CTGG CTGG CTGG C

FS5, FS25, FS45, FS65

silvestre 5′—GTCTGG CTGG CTGG C—3′

FS2, FS84

—GTCTGG CTGG C

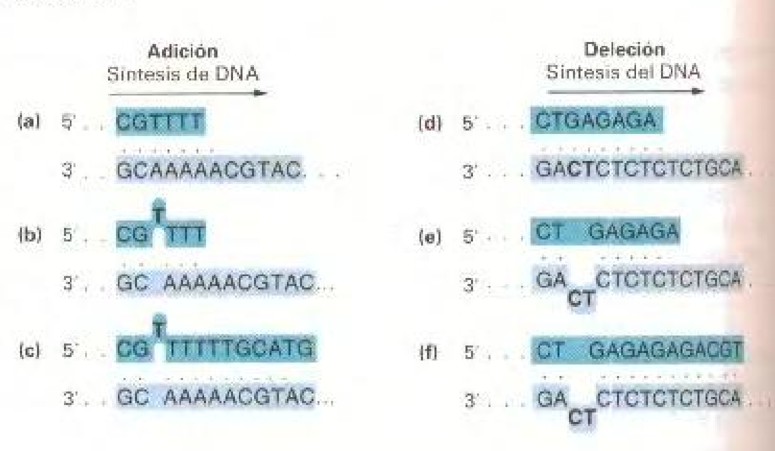


Figura 16-4. Versión simplificada del modelo de Streisinger para la aparición de una mutación de cambio de fase. (a—c) Durante la síntesis del DNA, la cadena recién sintetizada resbala, formándose un lazo de una a varias bases. Este lazo se estabiliza por el emparejamiento permitido por la unidad de secuencia repetida (las bases A, en este caso). En la siguiente ronda de replicación, se producirá la adición de un par de bases A—T. (d—f) Si, en lugar de la cadena recién sintetizada, resbala la cadena molde, se genera una deleción. En este caso, la unidad que se repite es un dinucleótido CT. Después del deslizamiento, se producirá una deleción de dos pares de bases (C—G y T—A) en la siguiente ronda de replicación.

El punto caliente más importante, representado aquí por las mutaciones *FS5*, *FS25*, *FS45* y *FS65*, resulta de la adición de un juego extra de cuatro bases, CTGG, a una de las cadenas del DNA. Este punto caliente revierte con mucha frecuencia, perdiendo el juego extra de cuatro bases. El punto caliente menos importante, representado aquí por las mutaciones *FS2* y *FS84*, resulta de la pérdida de una de las series de cuatro bases CTGG. Este mutante no recupera con facilidad el juego de cuatro bases perdido.

¿Cómo puede explicar el modelo de Streisinger estas observaciones? El modelo predice que la frecuencia de un cambio de fase particular depende del número de pares de bases que se pueden formar durante el emparejamiento erróneo deslizado de las secuencias repetidas. La secuencia silvestre mostrada para el gen *lacI* puede dejar fuera una secuencia CTGG y estabilizar la estructura mediante la formación de nueve pares de bases. (¿Puede resolver esto aplicando el modelo de la Figura 16-4 a la secuencia mostrada para el gen *lacI*?). Que se genere una deleción o una adición depende de si el deslizamiento ocurre en la cadena molde o en la sintetizada de nuevo, respectivamente. De forma similar, el mutante por adición puede dejar fuera una secuencia CTGG y estabilizar una estructura con 13 pares de bases (verifique esto para la secuencia *FS5* mostrada para *lacI*), lo que explica la rápida reversión de mutaciones como la *FS5*. Sin embargo, sólo hay cinco pares de bases disponibles para estabilizar

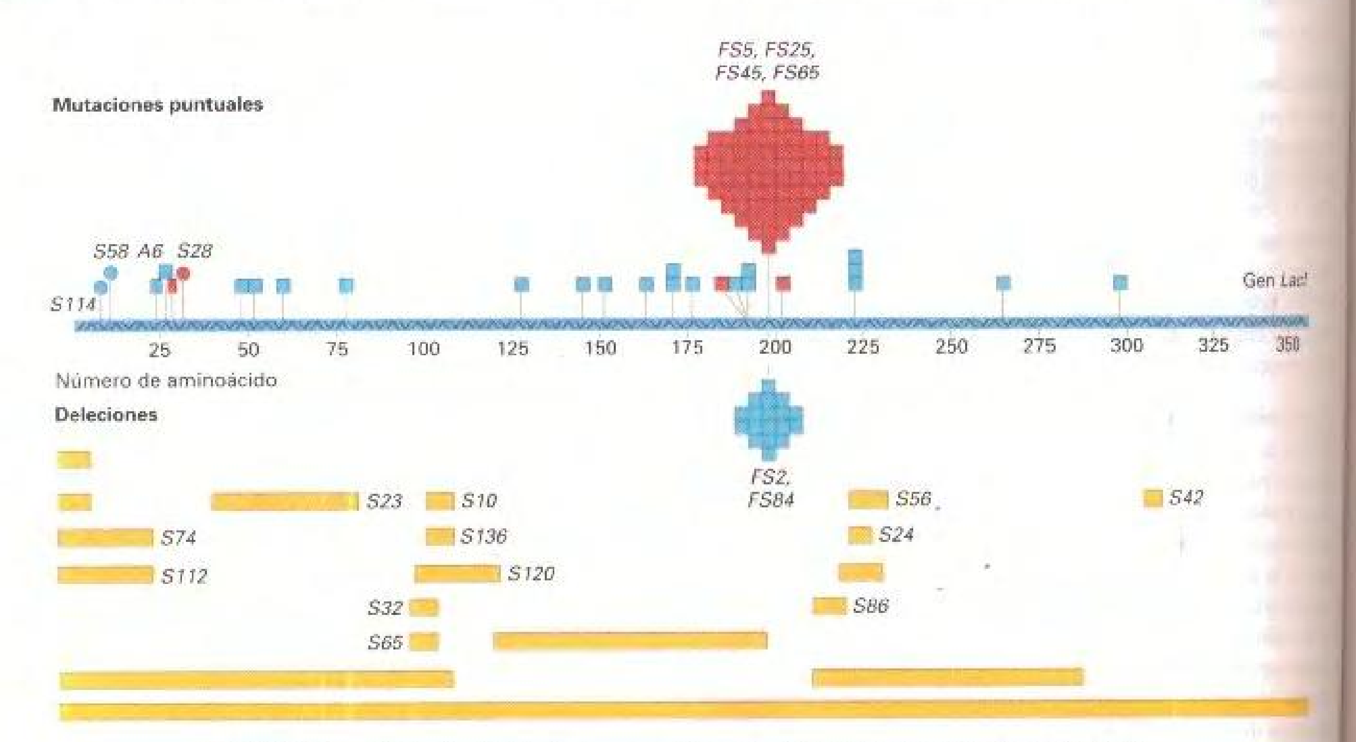


Figura 16-5. Distribución de 140 mutaciones espontáneas en *lacI*. Cada hecho de mutación puntual se indica con un recuadro. Los recuadros rojos representan mutaciones de reversión rápida. Las deleciones (amarillo) se representan abajo. El mapa de *I* se da en términos del número de aminoácidos del correspondiente represor *lac* cifrado en *I*. Los números de los alelos se refieren a las mutaciones que se han analizado a nivel de secuencia del DNA. Las mutaciones *S114* y *S58* (círculos) son resultado de la inserción de elementos genéticos transponibles (véase Cap. 20). *S28* (círculo rojo) es una duplicación de 88 pares de bases. (Tomado de J. Farabaugh, U. Schmeissner, M. Hofer y J. H. Miller, *Journal of Molecular Biology* 126, 1978, 847.)

S74, S112 75 bases

CAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACC-----CGCGTGGTGAACCAGG

Sitio (núm. of pb)	Secuencia repetida	Núm. de bases delecionadas	Sucesos
20 a 95	GTGGTGAA	75	2 *S74, S112*
146 a 269	GCGGCGAT	123	1 *S23*
331 a 351	AAGCGGCG	20	2 *S10, S136*
316 a 338	GTCGA	22	2 *S32, S65*
694 a 707	CA	13	1 *S24*
694 a 719	CA	25	1 *S56*
943 a 956	G	13	1 *S42*
322 a 393	Ninguna	71	1 *S120*
658 a 685	Ninguna	27	1 *S86*

Figura 16-6. Deleciones en *LacI*. Las deleciones que aparecen en *S74* y *S112* se muestran en la parte superior de la figura. Las deleciones se producen como indican las barras amarillas. Se deleciona una de las secuencias repetidas y todo el DNA intermedio, dejando una copia de la secuencia repetida. Todas las mutaciones se analizaron por determinación directa de la secuencia del DNA. (Tomado de J. Farabaugh, U. Schmeissner, M. Hofer y J. H. Miller, *Journal of Molecular Biology* 126, 1978, 847.)

una secuencia CTGG perdida en el mutante por deleción, lo que explica la reversión infrecuente de mutaciones como la *FS2* en la secuencia mostrada para *lacI*.

Deleciones y duplicaciones. Las **deleciones** grandes (de más de unos pocos pares de bases) representan una fracción considerable de las mutaciones espontáneas, como puede observarse en la Figura 16-5. La mayoría de las deleciones, aunque no todas, ocurren en secuencias repetidas. La Figura 16-6 muestra los resultados, presentados por Miller y sus colaboradores en 1978, de las primeras 12 deleciones que se analizaron a nivel de la secuencia del DNA. Estudios posteriores han demostrado que los puntos calientes para las deleciones son las secuencias repetidas de mayor longitud. Las **duplicaciones** de segmentos de DNA se han observado en muchos organismos. Como las deleciones, ocurren a menudo en secuencias repetidas.

¿Cómo se generan las deleciones y las duplicaciones? Se han propuesto varios mecanismos que podrían explicar su aparición. Por ejemplo, una extensión del modelo de Streisinger del emparejamiento erróneo deslizado (Fig. 16-4) podría explicar por qué las deleciones predominan en las secuencias repetidas cortas. Alternativamente, las deleciones y las duplicaciones podrían generarse mediante mecanismos de recombinación (que se describirán en el Cap. 19).

Lesiones espontáneas

Además de los errores en la replicación, las **lesiones espontáneas**, que son daños que se producen en el DNA de forma natural, también pueden causar mutaciones. Dos de las lesiones espontáneas más frecuentes son el resultado de la despurinización y de la desaminación.

La **despurinización**, la más común de las dos, implica la eliminación del enlace glucosídico entre la base y la desoxirribosa,

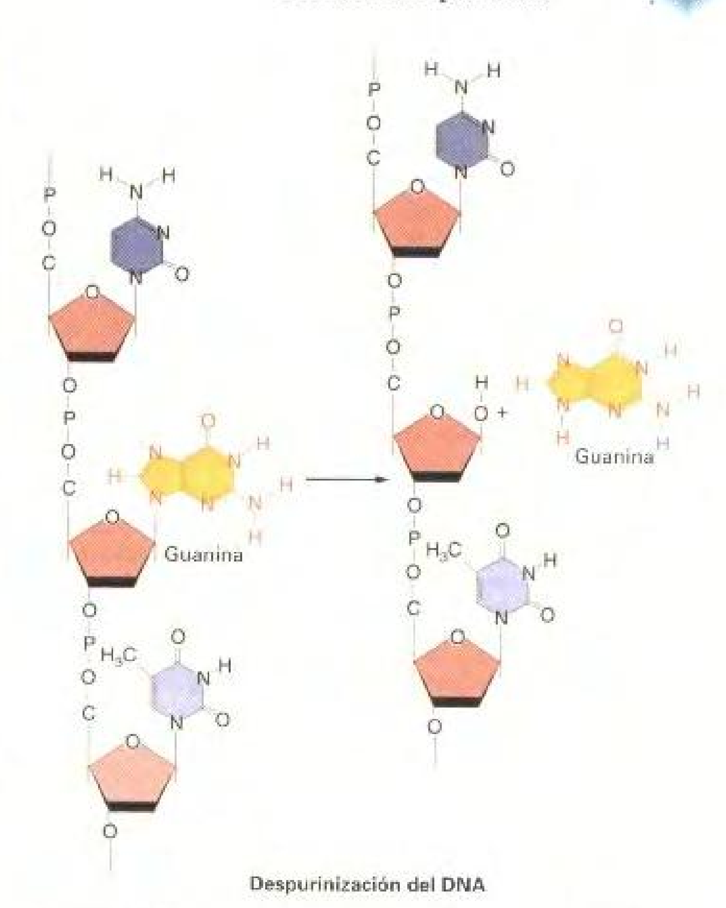


Figura 16-7. Pérdida de un residuo de purina (guanina) de una cadena sencilla de DNA. El esqueleto azúcar-fosfato queda intacto.

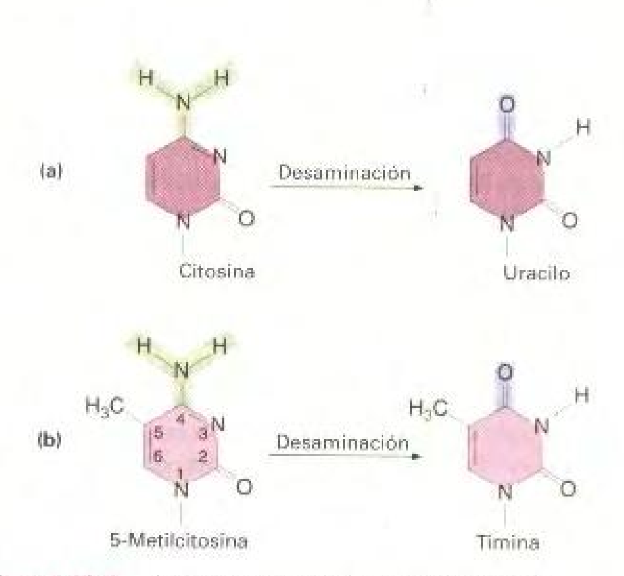


Figura 16-8. Desaminación de (a) citosina y (b) 5-metilcitosina.

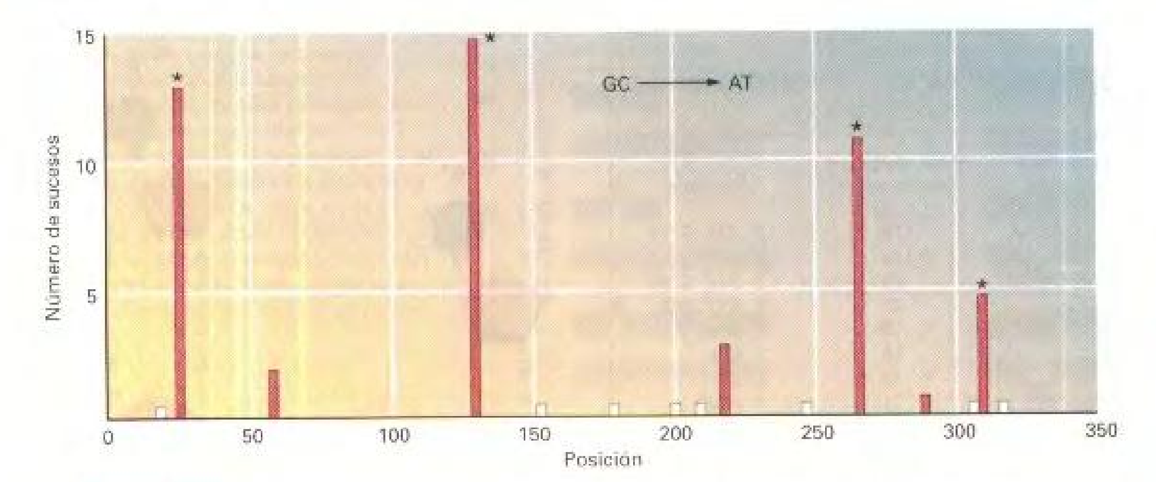


Figura 16-9. Puntos calientes de 5-metilcitosina en *E. coli*. Se indican las mutaciones sin sentido que aparecen en 15 sitios diferentes de *lacI*. Todas son resultado de una transición GC → AT. Los asteriscos (*) señalan las posiciones de los residuos de 5-metilcitosina. Las barras blancas representan los sitios en los se podría haber detectado un cambio GC → AT, sin que se produjera dicha mutación. Puede observarse que los residuos de 5-metilcitosina son puntos calientes para la transición GC → AT. De 50 mutaciones ocurridas independientemente, 44 estaban en 4 sitios de 5-metilcitosina y solamente 6 estaban en las 11 citosinas no metiladas. (Tomado de C. Coulondre *et al.*, *Nature* 274, 1978, 775.)

y la consiguiente pérdida de un residuo de guanina o adenina del DNA (Fig. 16-7). Una célula de mamífero pierde espontáneamente de su DNA alrededor de 10 000 purinas durante un tiempo de generación de 20 horas a 37 °C. Si estas lesiones persistieran, conducirían a un daño genético importante puesto que, en la replicación, los **sitios apurínicos** resultantes no podrían especificar una base complementaria a la purina original. No obstante, como veremos más tarde en el capítulo, sistemas de reparación eficaces eliminan los sitios sin purinas. Bajo ciertas condiciones (que se describirán más tarde), se puede insertar una base en un sitio apurínico; con frecuencia esto da como resultado una mutación.

La **desaminación** de la citosina produce uracilo (Fig. 16-8*a*). Residuos de uracilo no reparados emparejarán con adenina durante la replicación, produciendo la conversión de un par G—C en un par A—T (una **transición GC → AT**). En 1978, se demostró que la desaminación de ciertos residuos de citosina eran la causa de un tipo de punto caliente mutacional. El análisis de las secuencias de DNA de puntos calientes para la transición GC→AT demostró que aparecen residuos de 5-metilcitosina en cada punto caliente. (Ciertas bases están metiladas en los procariotas y los eucariotas). Algunos de los datos de este estudio del gen *lacI* se muestran en la Figura 16-9. La altura de cada barra de la gráfica representa la frecuencia de mutaciones en cada uno de los diferentes sitios. Puede observarse que las posiciones de los residuos de 5-metilcitosina correlacionan bien con los sitios más mutables.

¿Por qué son las 5-metilcitosinas puntos calientes mutacionales? Una de las enzimas de reparación de las células, la glucosilasa de uracilo de DNA, reconoce los residuos de uracilo que aparecen en el DNA por desaminación y los escinde, dejando un hueco que es rellenado con posterioridad (un proceso que se describirá más tarde en el capítulo). Sin embargo, la desaminación de la 5-metilcitosina (Fig. 16-8*b*) produce timina (5-metiluracilo), que no es reconocida por la enzima glucosilasa de uracilo de DNA y no es reparada. Por lo tanto, las transiciones C → T generadas por desaminación se observan con mayor frecuencia en los sitios de 5-metilcitosina, puesto que se escapan de este sistema de reparación.

Una consecuencia de la frecuencia con la que ocurre la mutación de 5-metilcitosina a timina es lo escasamente representados que están los dinucleótidos CpG en las células superiores, ya que esta secuencia se metila para dar 5-metil-CpG, que es gradualmente convertida en TpG.

Las **bases dañadas oxidativamente** representan un tercer tipo de lesión espontánea implicada en la mutagénesis. Especies activas del oxígeno, como los radicales superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH^-), se generan como subproductos del metabolismo normal aeróbico. Todas ellas pueden causar daños oxidativos en el DNA, así como en sus precursores (como el GTP), que dan lugar a mutaciones y que han sido relacionados con varias enfermedades humanas. La Figura 16-10 muestra dos productos del daño oxidativo. El producto 8-oxo-7-hidrodesoxiguanosina (8-oxodG o GO) empareja con frecuencia erróneamente con A, produciendo un elevado número de transversiones G → T. El glicol de timidina bloquea la replicación del DNA si no se repara, aunque aún no se le ha implicado en mutagénesis.

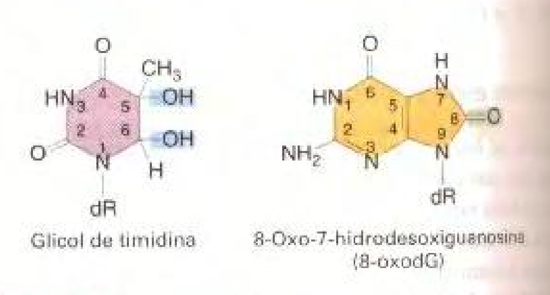


Figura 16-10. Productos que se encuentran en el DNA dañado después del ataque con radicales de oxígeno. dR = desoxirribosa.

COROLARIO

Las mutaciones espontáneas pueden originarse mediante diferentes procesos. Los errores en la replicación y las lesiones espontáneas producen la mayoría de las mutaciones por sustitución de bases y de cambios de fase. Los errores en la replicación pueden también causar algunas deleciones que ocurren en ausencia de tratamiento mutagénico.

Mutaciones espontáneas y enfermedades humanas

El análisis de las secuencias de DNA ha permitido identificar las mutaciones responsables de varias enfermedades hereditarias humanas. Los estudios sobre mutaciones bacterianas que hemos visto previamente nos permiten sugerir los mecanismos causantes de dichas enfermedades.

Varias de estas enfermedades se deben a **deleciones** o **duplicaciones** en las que están implicadas secuencias repetidas. Por ejemplo, las encefalomiopatías mitocondriales son un grupo de enfermedades que afectan al sistema nervioso central o a los músculos (síndrome de Kearns-Sayre). Se caracterizan por una disfunción en la fosforilación oxidativa (una función de las mitocondrias) y por cambios en la estructura mitocondrial. Se ha demostrado que estas dolencias son el resultado de deleciones que ocurren entre secuencias repetidas. La Figura 16-11 representa una de estas deleciones. Observe cuán similar es en la forma a las deleciones espontáneas de *E. coli* mostradas en la Figura 16-6.

Un mecanismo común que es responsable de varias enfermedades genéticas es la **expansión de una repetición de tres pares de bases**, que sucede por ejemplo en el caso del síndrome del X frágil (Fig. 16-12). Este síndrome es la forma más común de retraso mental hereditario, presentándose en cerca de 1 de cada

WT

····· ACCT ACCTCCCTCACCA AAGC ······ ~5000 pb ······ TTCA ACCTCCCTCACCA TTGG ·····



KS

······ ACCA ACCTCCCTCACCA TTGG ·····

Figura 16-11. Secuencias de DNA mitocondrial silvestre (WT) y delecionado (KS) de un paciente con el síndrome de Kearns-Sayre. La secuencia de 13 bases enmarcada es idéntica en WT y KS, y sirve como punto de ruptura para la deleción de DNA. Una única base (en negrita) está alterada en KS, al lado del segmento delecionado.

Expansión del triplete CGG

6-54 copias — Normal

50-200 copias — VNT

50-200 copias — Hija

200-1300 copias — Individuo afectado

Figura 16-12. Expansión del triplete CGG del gen *FMR-1* que aparece en el síndrome del X frágil. Los individuos normales contienen de 6 a 54 copias de la repetición CGG, mientras que los miembros de familias susceptibles presentan un aumento (premutación) en el número de repeticiones; los varones normales transmisores (VNT) y sus hijas son fenotípicamente normales, pero presentan de 50 a 200 copias del triplete CGG; el número de repeticiones se expande hasta alcanzar de 200 a 1300 en individuos que muestran los síntomas de la enfermedad.

1500 varones y 1 de cada 2500 mujeres. Citológicamente, se caracteriza por un sitio frágil en el cromosoma X que produce su rotura *in vitro*.

El modo de herencia del síndrome del cromosoma X frágil es inusual, en el sentido de que el 20 % de los varones con un cromosoma X frágil son fenotípicamente normales, si bien transmiten el cromosoma afectado a sus hijas, que también son normales. A estos varones se les conoce como varones normales transmisores (VNT). Sin embargo, los hijos varones de las hijas de los VNT muestran a menudo los síntomas. El síndrome del cromosoma X frágil está causado por mutaciones en una repetición $(CGG)_n$ dentro de la secuencia traducida del gen *FMR-1*. Los pacientes con el síndrome muestran metilación específica, inducida por la mutación, en una agrupación CpG cercana, que da lugar a una reducción en la expresión de *FMR-1*.

¿Por qué se manifiestan los síntomas en algunas personas con un cromosoma X frágil y no en otras? La respuesta parece residir en el número de repeticiones CGG en el gen *FMR-1*. En la especie humana, se observa normalmente una variación considerable en el número de repeticiones CGG en el gen *FMR-1*, que oscila desde 6 a 54, con 29 repeticiones en el alelo más frecuente. (La variación en las repeticiones CGG produce una variación correspondiente en el número de residuos de arginina [CGG es un codón para la arginina] en la proteína determinada por el gen *FMR-1*). Tanto los VNT como sus hijas tienen un número de repeticiones mucho mayor, que oscila entre 50 y 200. Este aumento en el número de repeticiones ha sido denominado **premutación**. Todos los alelos con una premutación son inestables. Los varones y las mujeres con síntomas de la enfermedad, así como muchas mujeres portadoras, presentan inserciones adicionales de DNA, que sugieren la presencia de 200 a 1300 repeticiones. Se ha demostrado que la frecuencia de la expansión aumenta con el tamaño de la inserción de DNA (y por tanto, presumiblemente, con el número de repeticiones). Aparentemente, el número de repeticiones en los alelos premutación encontrados en los VNT y sus hijas está por encima de un cierto umbral y, por tanto, la probabilidad de que se expanda a una mutación completa es mucho mayor que en el caso de los individuos normales.

El mecanismo propuesto para la aparición de estas repeticiones es un emparejamiento erróneo deslizado durante la síntesis del DNA (como se muestra en la Fig. 16-6), que implica la expansión en un solo paso de la secuencia de cuatro pares de bases CTGG. La frecuencia de mutación extraordinariamente elevada de las repeticiones de tres pares de bases en el síndrome del X frágil sugiere que en las células humanas, por encima de un umbral de alrededor de 50 repeticiones, la maquinaria de replicación no puede replicar fielmente la secuencia correcta, lo que da lugar a grandes variaciones en el número de repeticiones.

Una segunda enfermedad hereditaria, la atrofia muscular espinal y bulbar ligada al cromosoma X (conocida como enfermedad de Kennedy), también se debe a la amplificación de una repetición de tres pares de bases, en este caso del triplete CAG. La enfermedad de Kennedy, que se caracteriza por debilidad y atrofia muscular progresiva, se produce por mutaciones en el gen que determina el receptor de andrógenos. Los individuos normales tienen una media de 21 repeticiones CAG en este gen, mientras que los pacientes afectados tienen entre 40 y 52 repeticiones.

La distrofia miotónica, la forma más común de distrofia muscular en los adultos, constituye otro ejemplo de enfermedad humana cuya causa es la expansión de una secuencia. Las familias susceptibles muestran un aumento en la severidad de la enfermedad en generaciones sucesivas, debido a la amplificación progresiva de un triplete CTG presente en el extremo 3' de un transcrito. Los individuos normales poseen, por término medio, cinco copias de la repetición CTG; los individuos con afección leve tienen aproximadamente 50 copias, y los gravemente afectados más de 1000 repeticiones del triplete CTG. Ejemplos adicionales de expansión de un triplete están apareciendo continuamente, siendo un ejemplo más el de la enfermedad de Huntington.

Mutaciones inducidas

Especificidad mutagénica

Cuando observamos la distribución de las mutaciones inducidas por diferentes mutágenos, vemos una especificidad distintiva que caracteriza a cada mutágeno. Esta **especificidad mutagénica** fue observada por primera vez por Benzer, en 1961, en el sistema *rII* del fago T4. La especificidad surge por una «preferencia» de un mutágeno dado por ciertos *tipos* de mutaciones (por ejemplo, las transiciones GC→AT) y por ciertos *sitios* mutacionales (puntos calientes). La Figura 16-13 muestra la especificidad mutagénica en *lacI* de tres mutágenos que se describirán más tarde: el metanosulfonato de etilo (EMS), la luz ultravioleta (UV) y la aflatoxina B_1 (AFB_1). Las gráficas muestran la distribución de las mutaciones por sustitución de base que dan lugar a codones de terminación de la traducción UAG. La Figura 16-13 es similar a la Figura 9-26, que muestra la distribución de las mutaciones en *rII*, con la excepción de que, para *lacI*, se conocen los cambios de secuencia específicos para cada sitio, lo que permite desglosar las gráficas en cada categoría de sustitución.

La Figura 16-13 revela los dos componentes de la especificidad mutagénica. Primero, cada mutágeno mostrado favorece una categoría de sustitución específica. Por ejemplo, el EMS y la luz UV favorecen las transiciones GC → AT, mientras que la AFB favorece las transversiones GC → TA. Estas preferencias están relacionadas con los diferentes mecanismos de mutagénesis. Segundo, incluso dentro de la misma categoría, hay grandes diferencias en la tasa de mutación. Estas diferencias pueden observarse mejor en el caso de la luz UV para los cambios GC → AT. Alguna característica de la secuencia del DNA circundante debe ser la causante de estas diferencias. En algunos casos, la causa de los puntos calientes puede determinarse mediante estudios de la secuencia del DNA, como se describió previamente para los residuos de 5-metilcitosina y para ciertos sitios de cambio de fase (Figs. 16-5 y 16-9). En muchos ejemplos de puntos calientes inducidos por mutágenos, se desconoce todavía la razón exacta de la gran mutabilidad de sitios específicos. Sin embargo, la elevada frecuencia de lesiones en algunos sitios y la reparación reducida de ciertas posiciones son a veces las causas de los puntos calientes.

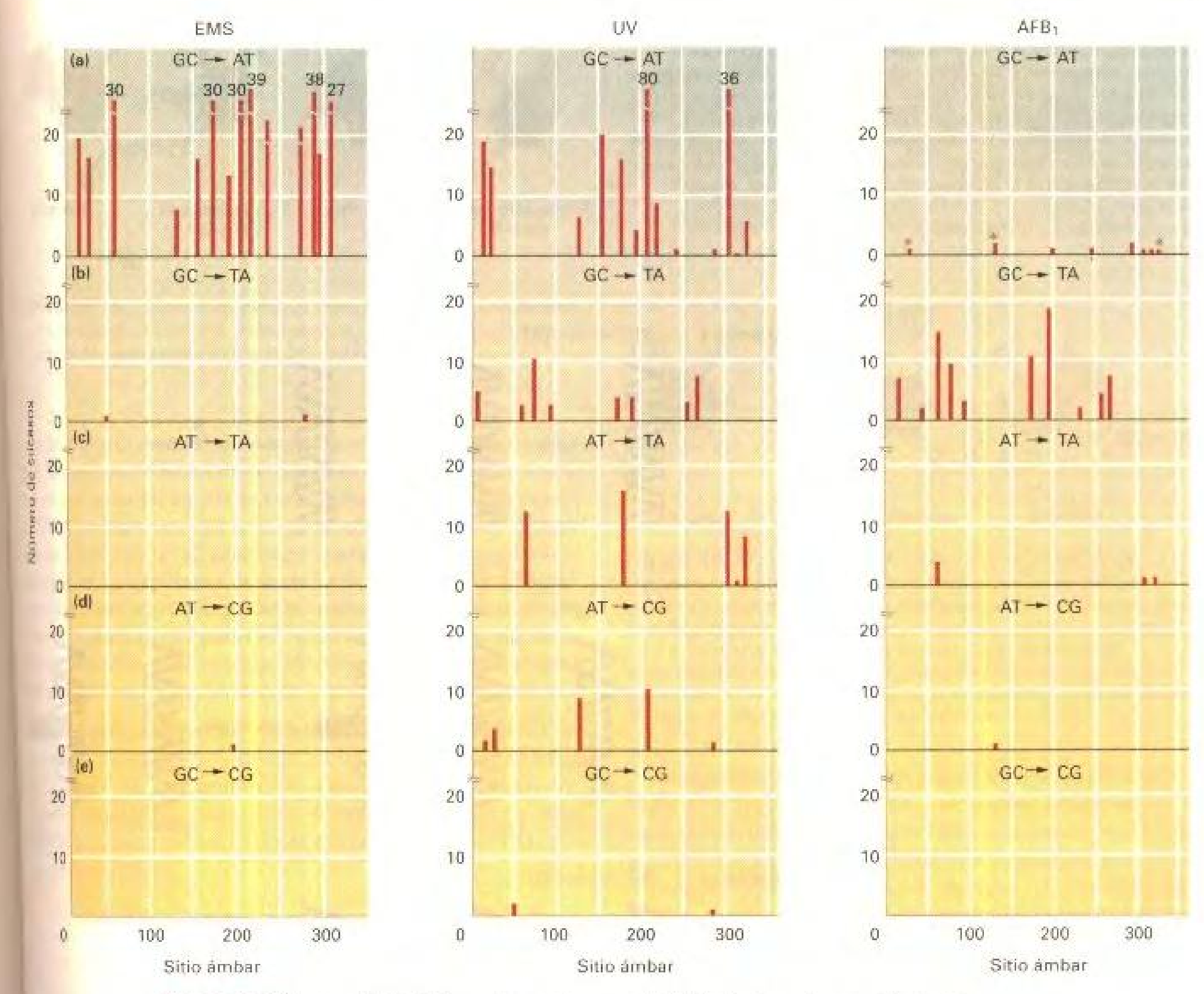


Figura 16-13. Especificidad de los mutágenos. Se muestra la distribución de mutaciones en 36 sitios del gen *lacI* para tres mutágenos: EMS, luz UV y aflatoxina B_1. La altura de cada barra representa el número de mutaciones en el sitio respectivo. Algunos puntos calientes están fuera de escala, con el número de sucesos indicado directamente encima del pico correspondiente. Por ejemplo, en la colección generada con luz UV, un sitio que resulta de una transición GC → AT está representado por 80 sucesos. Cada sitio mutacional mostrado en la figura genera un codón ámbar (UAG) en el correspondiente mRNA. Las mutaciones se ordenan de acuerdo con el tipo de sustitución de base. Los asteriscos indican las posiciones de las 5-metilcitosinas. (Adaptado de C. Coloandre y J. H. Miller, *Journal of Molecular Biology* 117, 1977, 577; y P. L. Foster et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80, 1983, 2695.)

Mecanismos de mutagénesis

Los mutágenos inducen mutaciones al menos mediante tres mecanismos diferentes. Pueden reemplazar una base del DNA, alterar una base de modo que se empareje erróneamente de forma específica con otra base o dañar una base de modo que, en condiciones normales, ya no pueda emparejarse con ninguna base.

Incorporación de análogos de bases. Algunos compuestos químicos son lo suficientemente parecidos a las bases nitrogenadas normales del DNA para que, ocasionalmente, se incorporen al DNA en lugar de éstas; tales compuestos se denominan **análogos de bases**. Una vez incorporados, estos análogos tienen propiedades de emparejamiento distintas de las que presentan las bases normales; de este modo, pueden causar mutaciones al provocar que, durante la replicación, se inserten nucleótidos incorrectos frente a ellos. El análogo de base original sólo está en una de las cadenas, pero puede provocar el cambio de un par de nucleótidos que se replica en todas las copias de DNA derivadas de la cadena original.

Por ejemplo, el **5-bromouracilo (5-BU)** es un análogo de la timina que contiene bromo en la posición C-5, en lugar del grupo CH_3 que aparece en la timina. Este cambio no afecta a los átomos que participan en los puentes de hidrógeno durante el emparejamiento de las bases, aunque la presencia de bromo altera de forma significativa la distribución de electrones en la base.

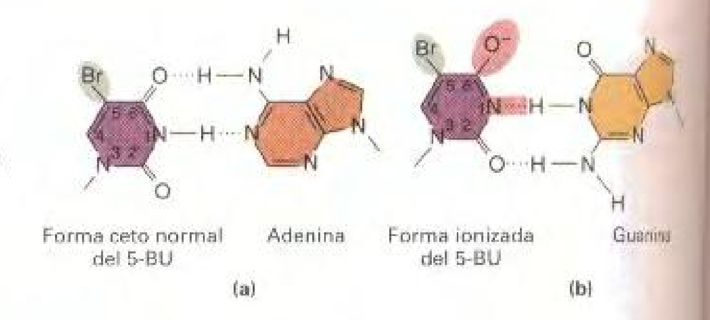


Figura 16-14. Posibles alternativas de emparejamiento para el 5-bromouracilo (5-BU). El 5-BU es un análogo de la timina que se puede incorporar erróneamente al DNA como una base. Posee un átomo de bromo en lugar del grupo metilo. (a) En su estado ceto normal, el 5-BU imita el comportamiento de la timina, a la que reemplaza, emparejándose con la adenina. (b) Sin embargo, la presencia de un átomo de bromo causa con relativa frecuencia una redistribución de los electrones, de manera que el 5-BU pasa parte de su existencia en la forma ionizada rara. En este estado, empareja con la guanina, imitando el comportamiento de la citosina e induciendo así mutaciones durante la replicación.

(a) Transición 1 AT ⟹ GC

A–T ⟹ A–5-BU$_T$ + A–T ⟹ Normal

Normal Frecuente Raro Mutante

A–T A–5-BU$_T$ G–5-BU$_C$ ⟹ G–C + A–5-BU

(b) Transición 2 GC ⟹ AT

G–C ⟹ G–5-BU$_C$ + G–C ⟹ Normal

Normal ⟸ G–C + A–5-BU$_T$ ⟹ A–T + A–5-BU$_T$

Normal Frecuente Mutante

Figura 16-15. Mecanismo de mutagénesis del 5-BU. El 5-BU produce mutaciones cuando se incorpora en una forma y luego cambia a otra forma. (a) En su estado ceto normal, el 5-BU empareja como la timina (5-BU$_T$). Por tanto, el 5-BU se incorpora frente a la adenina y los emparejamientos erróneos posteriores con la guanina dan lugar a transiciones AT → GC. (b) En su forma ionizada, el 5-BU empareja como la citosina (5-BU$_C$). Por tanto, el 5-BU se incorpora erróneamente frente a la guanina y los emparejamientos posteriores con adenina provocan transiciones GC → AT.

La estructura normal (la forma ceto) del 5-BU empareja con la adenina, como se muestra en la Figura 16-14*a*, pero puede cambiar con frecuencia a la forma enol o a una forma ionizada; la última empareja *in vivo* con la guanina (Fig. 16-14*b*). De esta forma, la naturaleza del par formado durante la replicación dependerá de la forma en que se encuentre el 5-BU en el momento [del] emparejamiento (Fig. 16-15). El 5-BU provoca casi ex[clusiva]mente transiciones, como se deduce de las Figuras 16-14 y 1[6-15].

Otro análogo muy utilizado en investigación es la **2-am[ino]purina (2-AP)**, un análogo de la adenina que puede em[pa-]

Figura 16-16. Posibles alternativas de emparejamiento para la 2-aminopurina (2-AP), un análogo de la adenina. Normalmente, la 2-AP empareja con la timina (a), pero en su estado protonado puede hacerlo con la citosina (b).

con la timina, aunque también puede emparejar erróneamente con la citosina cuando está en estado protonado, como se muestra en la Figura 16-16. Por lo tanto, cuando la 2-AP se incorpora al DNA mediante un emparejamiento con timina, puede generar transiciones AT → GC mediante emparejamiento erróneo con la citosina en las replicaciones posteriores. O, si la 2-AP se incorpora mediante un emparejamiento erróneo con la citosina, en ese caso provocará transiciones GC → AT cuando se empareje con la timina. Estudios genéticos han demostrado que la 2-AP, al igual que el 5-BU, es muy específica en la producción de transiciones.

Emparejamiento erróneo específico Algunos mutágenos no se incorporan al DNA, sino que en su lugar alteran una base, provocando un emparejamiento erróneo específico. Ciertos **agentes alquilantes**, tales como el **metanosulfonato de etilo** (EMS) y la ampliamente utilizada **nitrosoguanidina (NG)** operan de esta manera:

EMS

NG

Figura 16-17. Emparejamiento erróneo específico inducido por alquilación. La alquilación (en este caso, etilación causada por EMS) de la posición O-6 de la guanina, así como la de la posición O-4 de la timina, puede conducir a un emparejamiento erróneo con timina y guanina, respectivamente, como se muestra en la figura. En las bacterias, donde las mutaciones se han analizado con gran detalle, las principales mutaciones detectadas son transiciones GC → AT, lo que indica que la alquilación de la posición O-6 de la guanina es de mayor importancia en la mutagénesis.

Aunque tales agentes añaden grupos alquilo (un grupo etilo el EMS y un grupo metilo la NG) en muchas posiciones de las cuatro bases, la mutagenicidad correlaciona mejor con la adición al oxígeno situado en la posición 6 de la guanina, para formar *O*-6-alquilguanina. Esta adición provoca el emparejamiento erróneo con la timina, como se muestra en la Figura 16-17, lo que produciría transiciones GC → AT en la siguiente ronda de replicación. Como se esperaba, las determinación de la especificidad mutagénica del EMS y de la NG muestra una gran preferencia por las transiciones GC → AT (Vea los datos para el EMS que se muestran en la Fig. 16-13). Los agentes alquilantes también pueden modificar las bases de los dNTP (donde N puede ser cualquier base), que son precursores de la síntesis del DNA.

Figura 16-18. Agentes intercalantes. (a) Estructuras de los agentes comunes proflavina, naranja de acridina e ICR-191. (b) Un agente intercalante se desliza entre las bases apiladas situadas en el interior de la molécula de DNA. Este hecho conduce a inserciones y deleciones de un único par de nucleótidos. (Tomado de L. S. Lerman, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 49, 1963, 94.)

Los **agentes intercalantes** constituyen otra clase importante de modificadores del DNA. Este grupo de compuestos incluye la **proflavina**, el **naranja de acridina** y una clase de compuestos químicos denominados **compuestos ICR** (Fig. 16-18*a*). Estos agentes son moléculas planas, que imitan a los pares de bases y son capaces de deslizarse (**intercalarse**) entre las bases nitrogenadas que están apiladas en el interior de la doble hélice del DNA (Fig. 16-18*b*). En esta posición intercalada, el agente puede producir inserciones o deleciones de un único par de nucleótidos. Los agentes intercalantes también pueden apilarse entre las bases de un DNA de cadena sencilla; y de esta manera, pueden estabilizar bases que están en un lazo durante una mutación de cambio de fase, como se representa en el modelo de Streisinger (Fig. 16-4).

Daños estructurales en las bases. Un gran número de mutágenos dañan una o más bases, de manera que se imposibilita el emparejamiento específico entre las bases. El resultado es un bloqueo de la replicación, puesto que la síntesis del DNA no continuará más allá de una base que no puede especificar a su complementaria mediante enlaces por puente de hidrógeno. En las células bacterianas, este bloqueo de la replicación puede *evitarse* mediante la inserción de bases no específicas. El proceso requiere la activación de un sistema especial, el **sistema SOS** (Fig. 16-19). El nombre de SOS deriva de la idea de que este sistema se induce como una respuesta de emergencia para impedir la muerte de la célula en el caso de que se produzca un daño significativo en el DNA. La inducción de SOS es un último recurso, que permite la supervivencia de la célula a cambio de un cierto grado de mutagénesis.

No está claro cómo funciona exactamente el sistema SOS, aunque se sabe que en *E. coli* depende al menos de tres genes: *recA* (que también está implicado en el mecanismo de recombinación general), *umuC* y *umuD*. Los modelos actuales para el sistema SOS sugieren que las proteínas UmuC y UmuD interaccionan con el complejo de replicación de la polimerasa de DNA III, provocando la relajación de su normalmente estricta especificidad y permitiendo así la replicación más allá de las lesiones que producían el bloqueo.

La Figura 16-19 muestra un modelo para el sistema SOS, que en este ejemplo actúa después de que la polimerasa de DNA III se detenga en un tipo de daño denominado fotodímero T—C. Puesto que la replicación puede proseguir aguas abajo del dímero, se genera una región de DNA de cadena sencilla. Esta región atrae a la proteína estabilizadora Ssb, la proteína de unión a cadena sencilla, así como a la proteína RecA, que forma filamentos e induce la síntesis de las proteínas UmuC y UmuD. La proteína UmuD se une a los filamentos y es cortada por la acción de la proteína RecA, dando lugar a una versión más corta denominada UmuD', que a continuación se une a la proteína UmuC para formar un complejo que permite que la polimerización del DNA continúe más allá del dímero, añadiendo bases con una elevada frecuencia de error (véase la Fig. 16-19).

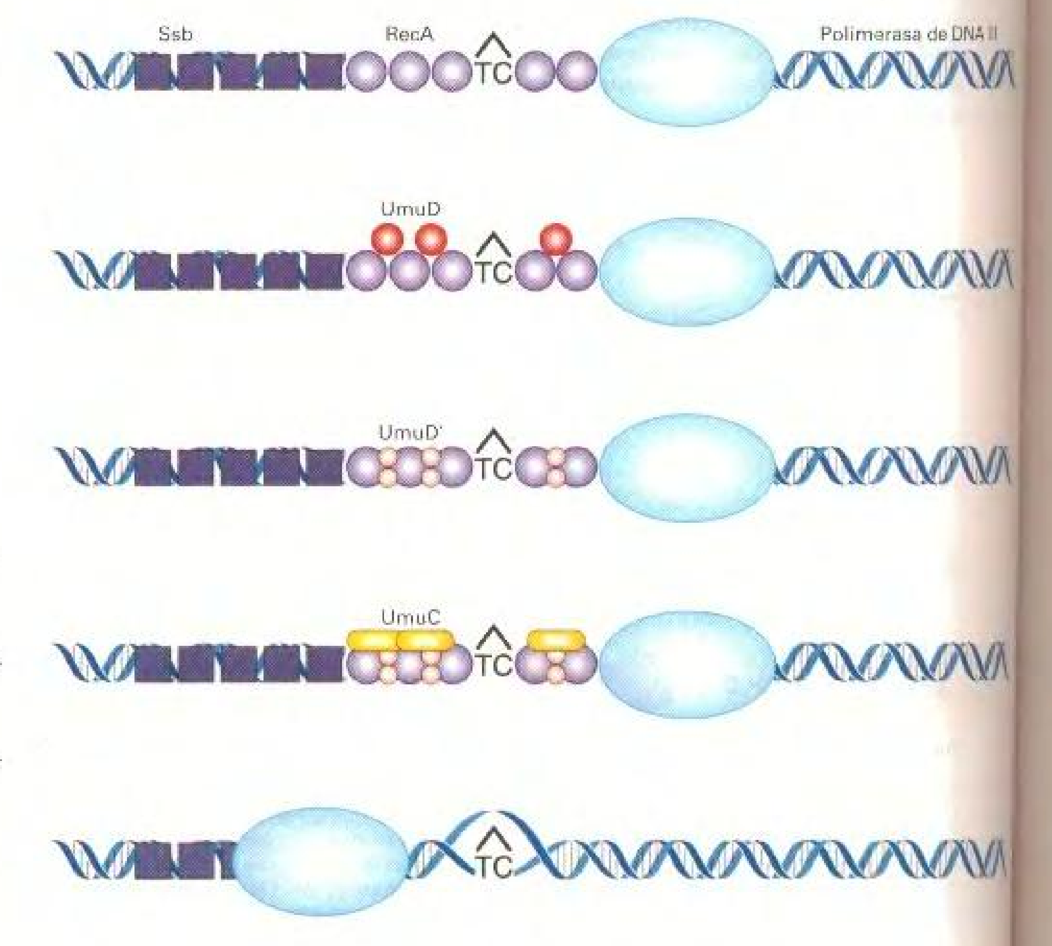
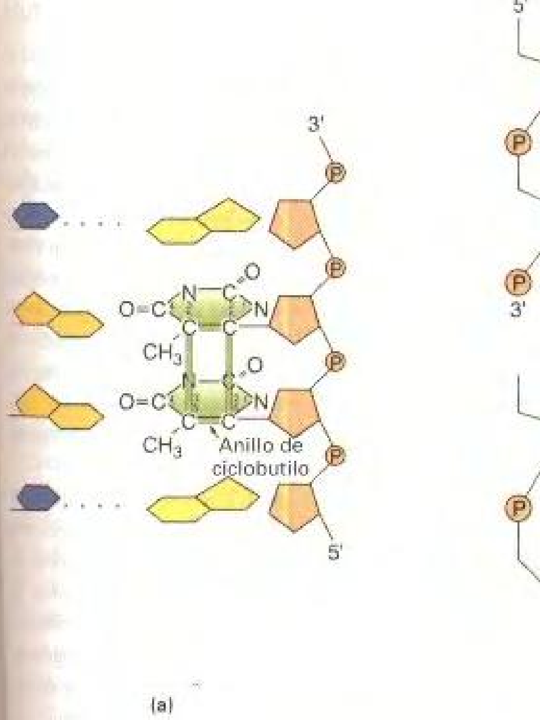


Figura 16-19. Sistema SOS. La polimerasa de DNA III, mostrada en azul, se detiene en una lesión como el fotodímero T—C mostrado en la figura, lo que genera una región de cadena sencilla que atrae a la proteína Ssb (púrpura oscuro) y a la RecA (púrpura claro), que forma filamentos. La presencia de los filamentos RecA permite que la célula sintetice UmuD (círculos rojos), que es cortada por la acción de RecA para dar lugar a UmuD' (círculos rosas), y UmuC (óvalos amarillos). UmuC forma un complejo con UmuD' que permite que la polimerización del DNA continúe más allá de la lesión bloqueadora.



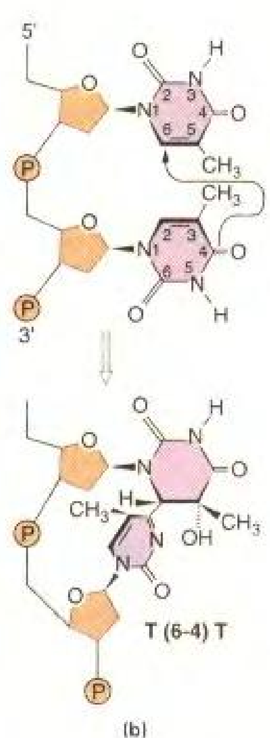


Figura 16-20. (a) Estructura del dímero ciclobutano-pirimidina. La luz ultravioleta estimula la formación de un anillo de ciclobutano (verde) entre dos pirimidinas adyacentes de la misma cadena del DNA mediante su acción sobre los dobles enlaces 5,6. (b) Estructura del fotoproducto 6-4. La estructura se forma entre las posiciones C-6 y C-4 de dos pirimidinas adyacentes, por lo general 5'-CC-3' y 5'-TC-3', produciendo una perturbación significativa en la estructura local de la doble hélice. (Parte a tomada de E. C. Friedberg, *DNA Repair*, Copyright © 1985 de W. H. Freeman and Company; parte b tomada de E. C. Friedberg, *DNA Repair*. Copyright © 1985 de W. H. Freeman and Company. Adaptado de A. M. R. Taylor, C. M. Rosney y J. B. Campbell, *Cancer Research* 39, 1979, 1046-1050.)

Por lo tanto, los mutágenos que dañan sitios de emparejamiento específico de bases dependen del sistema SOS para su acción. La categoría de los mutágenos dependientes del sistema SOS es importante, ya que incluye a la mayoría de los agentes que causan cáncer (carcinógenos), como la luz ultravioleta, la aflatoxina B_1 y el benzo(a)pireno (que se comentarán más tarde).

¿De qué forma permite el sistema SOS la recuperación de las mutaciones tras la mutagénesis? ¿Disminuye el sistema SOS la fidelidad de la replicación del DNA tanto (para permitir la replicación a pesar de las lesiones) que se producen errores en la replicación incluso en el DNA no dañado? Si esta hipótesis fuera correcta, la mayoría de las mutaciones generadas por diferentes mutágenos dependientes de SOS serían similares, en lugar de ser específicas de cada mutágeno. La mayoría de las mutaciones se producirían por la propia acción del sistema SOS sobre el DNA no dañado. En este caso, el mutágeno desempeñaría la función indirecta de inducir al sistema SOS. Sin embargo, los estudios de la especificidad mutagénica han demostrado que no es esto lo que sucede. Por el contrario, los diferentes mutágenos dependientes de SOS poseen especificidades marcadamente distintas, como se puede comprobar para la luz UV y la aflatoxina B_1 en la Figura 16-13. Cada mutágeno induce su propia distribución de mutaciones. Por lo tanto, las mutaciones deben generarse en respuesta a sitios de bases dañados específicos. El tipo de lesión difiere en muchos casos. Algunas de las lesiones más ampliamente estudiadas incluyen los fotoproductos de la luz UV y los sitios apurínicos.

La luz **ultravioleta** genera varios fotoproductos del DNA. Dos lesiones diferentes que ocurren en residuos adyacentes de pirimidina —el fotodímero ciclobutano-pirimidina y el fotoproducto 6-4 (Fig. 16-20) —se han relacionado estrechamente con la mutagénesis. Estas lesiones interfieren con el emparejamiento normal de las bases; por tanto, se requiere la inducción del sistema SOS para la mutagénesis. La inserción incorrecta de bases frente a los fotoproductos de la luz UV tiene lugar en la posición 3' del dímero, siendo más frecuente para los dímeros 5'-CC-3' y 5'-TC-3'. La mutación más frecuente es la transición C → T, aunque la luz UV también estimula otras sustituciones de bases (transversiones) y cambios de fase, así como duplicaciones y deleciones. La especificidad mutagénica de la luz UV se ilustra en la Figura 16-13.

Radiación ionizante

La radiación ionizante causa la formación de moléculas ionizadas y excitadas que pueden dañar los componentes celulares y el DNA. Puesto que los sistemas biológicos poseen una naturaleza acuosa, las moléculas generadas por los efectos de la radiación ionizante sobre el agua producen la mayor parte del daño. Se originan muchos tipos diferentes de especies reactivas del oxígeno con radicales superóxido, como el ·OH. Los productos de reacción biológicamente más relevantes son el ·OH, el O_2^- y el H_2O_2. Estas especies pueden dañar las bases, dando lugar a diferentes productos de adición y de degradación. Entre los más corrientes, que provocan mutaciones, se encuentran el glicol de timina y el 8-oxodG, representados en la Figura 16-10. La radiación ionizante puede causar la rotura del enlace N-glucosídico, conduciendo a la formación de sitios apurínicos, así como roturas de las cadenas del DNA que son las responsables de los efectos letales de esta radiación.

La **aflatoxina B_1** es un carcinógeno poderoso, que origina **sitios apurínicos** tras la formación de un producto de adición en la posición N-7 de la guanina (Fig. 16-21). Los estudios de los sitios apurínicos generados *in vitro* han demostrado la necesidad del

Guanina

Aflatoxina B_1

Esqueleto de DNA

Figura 16-21. Unión al DNA de la aflatoxina B_1 activada metabólicamente.

sistema SOS, que inserta generalmente una adenina frente al sitio apurínico. Así, los agentes que producen la despurinización en los residuos de guanina deberían inducir preferentemente transversiones GC → TA. ¿Puede ver por qué la inserción de una adenina frente a un sitio apurínico que deriva de una guanina daría lugar a esta sustitución en la siguiente ronda de replicación? La Figura 16-13 muestra el análisis genético de muchas sustituciones de bases inducidas por la AFB_1. Puede verificar que, de hecho, la mayoría de las sustituciones son transversiones GC → TA.

La AFB_1 es un miembro de una clase de carcinógenos químicos que originan **productos de adición voluminosos** cuando se unen covalentemente al DNA. Otros ejemplos incluyen los diol epóxidos de **benzo(a)pireno**, un compuesto producido por los motores de combustión interna. En cuanto a otros muchos compuestos diferentes, no está todavía claro qué productos de adición desempeñan el papel principal en la mutagénesis. En algunos casos, la especificidad mutagénica sugiere que la despurinización puede constituir una etapa intermedia de la mutagénesis; en otros, todavía se desconoce cuál es el mecanismo implicado.

COROLARIO

Los mutágenos inducen mutaciones mediante varios mecanismos diferentes. Algunos mutágenos mimetizan las bases normales y se incorporan al DNA, donde luego establecen emparejamientos incorrectos. Otros dañan las bases y producen emparejamientos erróneos específicos, o impiden completamente el emparejamiento porque eliminan el reconocimiento entre las bases. En este último caso, debe inducirse el sistema SOS para permitir que la replicación progrese más allá de la lesión.

Análisis de reversión

El análisis por reversión de una mutación puede aportarnos información sobre la naturaleza de la mutación o la acción de un mutágeno. Por ejemplo, si una mutación no puede revertirse por la acción del mutágeno que lo indujo, entonces el mutágeno debe ejercer algún tipo de acción unidireccional relativamente específica. En una mutación inducida por hidroxilamina (HA), por ejemplo, sería razonable esperar que la mutación original fuera GC → AT, que no podría revertirse por otro hecho específico GC → AT. De igual forma, las mutaciones que pueden revertir con proflavina son con toda probabilidad mutaciones de cambio de fase; por lo que, las mutaciones inducidas por ácido nitroso (NA), que son transiciones, no deberían ser revertidas con proflavina.

Las transversiones no pueden inducirse con los agentes mencionados anteriormente, aunque se sabe de una forma definitiva que son comunes entre las mutaciones espontáneas, como demuestran los estudios de secuenciación de DNA y proteínas. De esta forma, si en el test de reversión una mutación revierte espontáneamente, pero no lo hace en respuesta a un mutágeno de transición o a un mutágeno de cambio de fase, entonces, por eliminación, se trata probablemente de una transversión.

El Cuadro 16-1 resume algunas predicciones basadas en suposiciones sencillas sobre el análisis de reversión. Recuerde que las especificidades mutagénicas dependen del organismo, del genotipo, del gen estudiado y de la acción de los sistemas biológicos de reparación. Observe que el tipo de lógica empleada en el análisis de reversión depende en gran manera de la suposición de que los hechos de reversión no se deben a supresores ni a elementos transponibles; cualquiera de ellos dificultaría mucho las deducciones del análisis de reversión.

Relación entre mutágenos y carcinógenos

Se acepta que existe una clara correlación entre mutagenicidad y carcinogenicidad. Un estudio ha demostrado que 157 de 175 carcinógenos conocidos (aproximadamente el 90 %) también son mutágenos. La **teoría de la mutación somática** para el cáncer sostiene que estos agentes producen cáncer mediante la inducción de mutaciones en las células somáticas. De ello se deduce una gran importancia de la mutagénesis para nuestra sociedad.

CUADRO 16-1. Pruebas de reversión

Mutación	MUTÁGENO EMPLEADO EN LA REVERSIÓN			Reversión espontánea
	NA	HA o EMS	Proflavina	
Transición (GC → AT)	+	–	–	+
Transición (AT → GC)	+	+	–	+
Transversión	–	–	–	+
Cambio de fase	–	–	+	+

Nota: el signo + indica una tasa de reversión significativa con un mutágeno dado. NA, ácido nitroso; HA, hidroxilamina; EMS, metanosulfonato de etilo.

Mutaciones inducidas y cáncer humano

El conocimiento de la especificidad de los mutágenos en las bacterias ha llevado a la implicación directa de ciertos mutágenos ambientales como causas del cáncer en la especie humana. Desde hace tiempo se sospecha que la luz ultravioleta y la aflatoxina B_1 están relacionadas con el cáncer de piel y el de hígado, respectivamente. En la actualidad, el análisis de las secuencias del DNA de mutaciones en un gen humano ha aportado pruebas directas de la implicación de estos compuestos en el cáncer. El gen en cuestión se denomina ***p53*** y es uno de los varios genes **supresores de tumores**: genes que determinan proteínas que suprimen la formación de tumores (estudiaremos estos genes con mayor detalle en el Cap. 23). Una considerable proporción de pacientes con cáncer presentan mutaciones en genes supresores de tumores.

El cáncer de hígado es muy frecuente en el sur de África y el este de Asia, donde se ha correlacionado la alta incidencia de este tipo de cáncer con una elevada exposición a AFB_1. Cuando se analizaron mutaciones en *p53*, se encontraron transversiones G → T, las mutaciones típicas inducidas por AFB_1, en pacientes con cáncer de hígado del sur de África y del este de Asia, pero no en pacientes de esas regiones con cáncer de pulmón, colon o mama. Por otro lado, las mutaciones en *p53* de pacientes con cáncer de hígado de áreas con baja exposición a AFB_1 no eran transversiones G → T. Estos descubrimientos, junto a los resultados de los estudios de la especificidad mutagénica de la AFB_1 (véase la Fig. 16-13), nos permiten concluir que las mutaciones inducidas por AFB_1 son una causa principal del cáncer de hígado en el sur de África y el este de Asia.

La secuenciación de las mutaciones en *p53* ha reforzado también la relación entre la luz UV y los cánceres de piel humanos. La mayoría de los carcinomas invasivos escamosos analizados hasta ahora en la especie humana presentan mutaciones en *p53*. Todas ellas son mutaciones en sitios con dos pirimidinas, la mayoría de los cuales son sustituciones C → T cuando C es la pirimidina en la posición 3′ del dímero TC. Además, varios tumores presentan mutaciones en *p53* causadas por cambios dobles de bases CC → TT, que aparecen con mayor frecuencia entre las mutaciones inducidas con luz UV.

El medio ambiente actual expone a todos los individuos a una amplia variedad de productos químicos, en forma de medicamentos, cosméticos, conservantes alimenticios, pesticidas, compuestos utilizados en la industria, contaminantes, etc. Se ha demostrado que muchos de estos compuestos son mutágenos y carcinógenos. Algunos ejemplos son el conservante alimenticio AF-2, el fumigante alimenticio dibromuro de etileno, el medicamento *hycanthone* (empleado contra el esquistosoma), varios aditivos de tintes para el cabello y el compuesto industrial cloruro de vinilo. Todos ellos son potentes y, en consecuencia, algunos han sido objeto de controles gubernamentales. Sin embargo, cada semana aparecen en el mercado cientos de compuestos químicos nuevos. ¿Cómo se puede comprobar la carcinogenicidad de un número tan amplio de nuevos agentes antes de que la población quede expuesta a ellos?

Test de Ames

Se han ideado muchos sistemas para detectar la carcinogenicidad. Se trata de pruebas que duran mucho tiempo y que normalmente implican una investigación laboriosa con mamíferos pequeños. Las pruebas más rápidas existentes emplean microorganismos (como hongos o bacterias) y detectan la mutagenicidad más que la carcinogenicidad. La prueba más ampliamente utilizada fue desarrollada en los años setenta por Bruce Ames, que trabajó con *Salmonella typhimurium*. El **test de Ames** utiliza dos mutaciones de auxotrofía para la histidina, que revierten por diferentes mecanismos moleculares (Fig. 16-22). Mediante técnicas genéticas, se han incorporado propiedades adicionales a estas estirpes que las hacen idóneas para la detección de mutágenos. En primer lugar, llevan una mutación que inactiva el sistema de reparación por escisión (que describiremos más tarde). En segundo lugar, llevan otra mutación que elimina la cubierta protectora de lipopolisacárido de la estirpe silvestre de *Salmonella*, lo que facilita la entrada a la célula de muchos productos químicos diferentes.

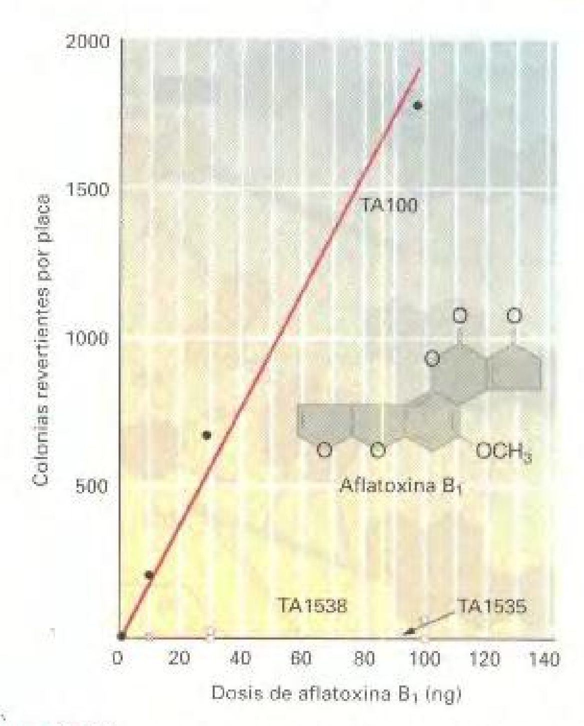


Figura 16-22. Resultados del test de Ames en los que se muestra la mutagenicidad de la aflatoxina B_1, también un potente carcinógeno. TA100, TA1538 y TA1535 son estirpes de *Salmonella* que llevan diferentes mutaciones auxotróficas *his*. La estirpe TA100 es muy sensible a la reversión mediante cambios de pares de bases. Las estirpes TA1535 y TA1538 son sensibles a la reversión mediante mutaciones de cambio de fase. Los resultados del test muestran que la aflatoxina B_1 es un potente mutágeno que produce cambios de pares de bases, pero no cambios de fase. (Tomado de J. McCann y B. N. Ames, en *Advances in Modern Technology*, Vol. 5. Editado por W. G. Flamm y M. A. Mehlman. Copyright © de Hemisphere Publishing Corp., Washington, D.C.)

Evolutivamente, las bacterias están muy alejadas de la especie humana. ¿Pueden tener los resultados de una prueba bacteriana alguna significación para la detección de productos químicos peligrosos para la especie humana? En primer lugar, hemos visto que la naturaleza genética y química del DNA es idéntica en todos los organismos, de forma que un compuesto que actúe como mutágeno en un organismo es probable que tenga un efecto mutagénico en otros organismos. En segundo lugar, Ames

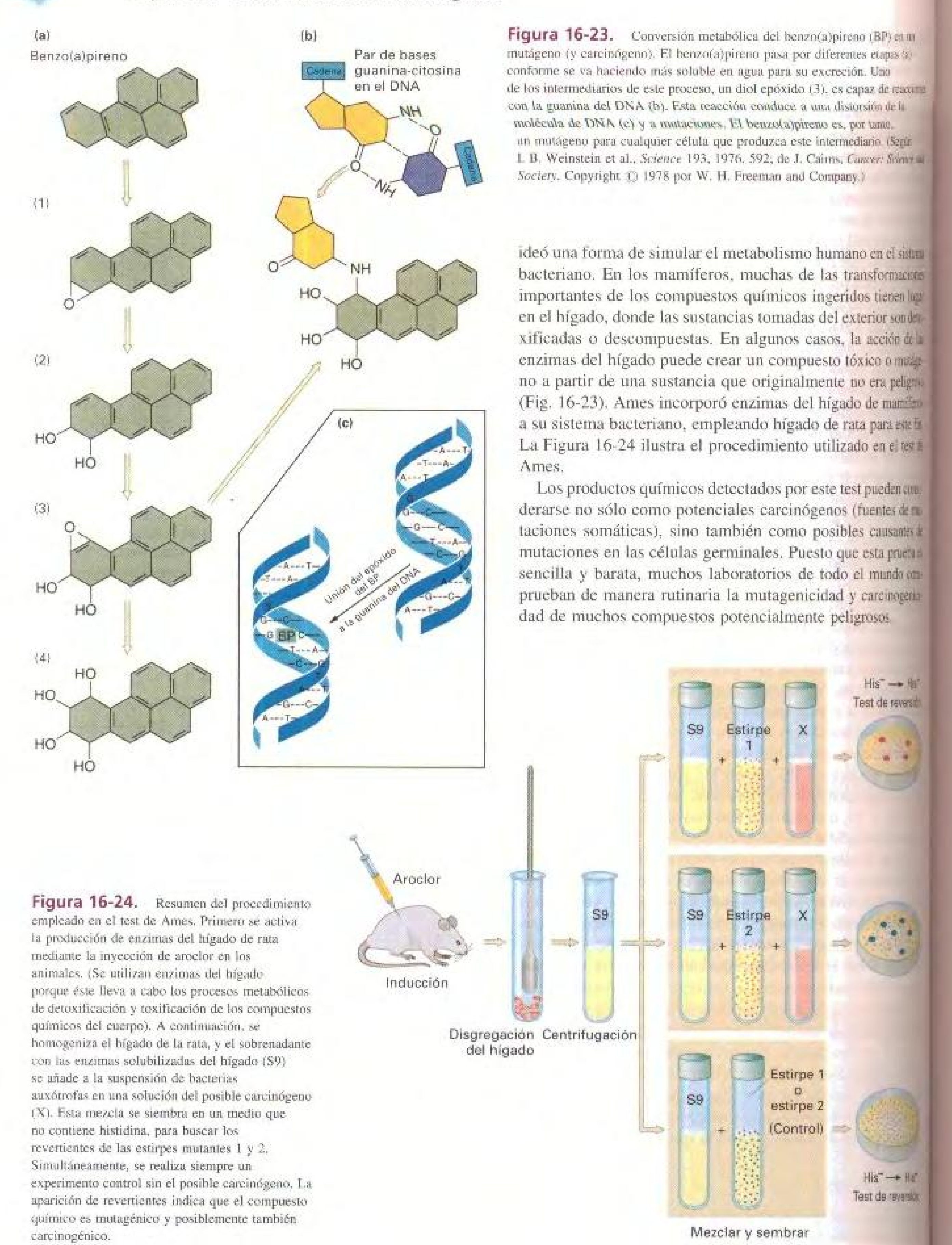


Figura 16-23. Conversión metabólica del benzo(a)pireno (BP) en un mutágeno (y carcinógeno). El benzo(a)pireno pasa por diferentes etapas (a) conforme se va haciendo más soluble en agua para su excreción. Uno de los intermediarios de este proceso, un diol epóxido (3), es capaz de reaccionar con la guanina del DNA (b). Esta reacción conduce a una distorsión de la molécula de DNA (c) y a mutaciones. El benzo(a)pireno es, por tanto, un mutágeno para cualquier célula que produzca este intermediario. (Según I. B. Weinstein et al., *Science* 193, 1976, 592; de J. Cairns, *Cancer: Science and Society*. Copyright © 1978 por W. H. Freeman and Company.)

Figura 16-24. Resumen del procedimiento empleado en el test de Ames. Primero se activa la producción de enzimas del hígado de rata mediante la inyección de aroclor en los animales. (Se utilizan enzimas del hígado porque éste lleva a cabo los procesos metabólicos de detoxificación y toxificación de los compuestos químicos del cuerpo). A continuación, se homogeniza el hígado de la rata, y el sobrenadante con las enzimas solubilizadas del hígado (S9) se añade a la suspensión de bacterias auxótrofas en una solución del posible carcinógeno (X). Esta mezcla se siembra en un medio que no contiene histidina, para buscar los revertientes de las estirpes mutantes 1 y 2. Simultáneamente, se realiza siempre un experimento control sin el posible carcinógeno. La aparición de revertientes indica que el compuesto químico es mutagénico y posiblemente también carcinogénico.

ideó una forma de simular el metabolismo humano en el sistema bacteriano. En los mamíferos, muchas de las transformaciones importantes de los compuestos químicos ingeridos tienen lugar en el hígado, donde las sustancias tomadas del exterior son detoxificadas o descompuestas. En algunos casos, la acción de las enzimas del hígado puede crear un compuesto tóxico o mutágeno a partir de una sustancia que originalmente no era peligrosa (Fig. 16-23). Ames incorporó enzimas del hígado de mamífero a su sistema bacteriano, empleando hígado de rata para este fin. La Figura 16-24 ilustra el procedimiento utilizado en el test de Ames.

Los productos químicos detectados por este test pueden considerarse no sólo como potenciales carcinógenos (fuentes de mutaciones somáticas), sino también como posibles causantes de mutaciones en las células germinales. Puesto que esta prueba es sencilla y barata, muchos laboratorios de todo el mundo comprueban de manera rutinaria la mutagenicidad y carcinogenicidad de muchos compuestos potencialmente peligrosos.

Mecanismos biológicos de reparación

Como hemos visto en secciones anteriores, existen muchas amenazas potenciales para la fidelidad de la replicación del DNA. No sólo hay una tasa de error inherente a la replicación del DNA, sino que también ocurren lesiones espontáneas que añaden nuevos errores. Además, los mutágenos presentes en el ambiente pueden dañar el DNA y aumentar enormemente la tasa de mutación.

Las células vivas han desarrollado una serie de sistemas enzimáticos que reparan los daños en el DNA de varias formas. El fallo de estos sistemas conduce a un aumento en la tasa de mutación. Como veremos más adelante, varias enfermedades humanas que incluyen a ciertos tipos de cánceres pueden atribuirse a defectos en la reparación del DNA. Examinaremos primero algunos de los mecanismos de reparación caracterizados, para considerar a continuación cómo integra la célula estos sistemas en una estrategia global de reparación.

Los mecanismos de reparación se pueden clasificar en varias categorías.

Prevención de los errores antes de que ocurran

Algunos sistemas enzimáticos neutralizan los compuestos potencialmente dañinos antes de que reaccionen con el DNA. Un ejemplo de estos sistemas es la detoxificación de los radicales superóxido producidos durante el daño oxidativo del DNA: la enzima **dismutasa del superóxido** cataliza la conversión de los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno, y la enzima **catalasa**, a su vez, convierte el peróxido de hidrógeno en agua. Otro mecanismo que evita los errores antes de que ocurran depende del producto proteico del gen *mutT*: esta enzima impide la incorporación al DNA de 8-oxodG (véase la Fig. 16-10), que aparece por la oxidación de dGTP, mediante la hidrólisis del trifosfato de la 8-oxodG a la forma monofosfato.

Reversión directa del daño

La forma más simple de reparar una lesión, una vez que ha ocurrido, es eliminarla directamente, regenerando a continuación la base normal. No siempre es posible la reversión, ya que algunos tipos de daños son esencialmente irreversibles. Sin embargo, en unos pocos casos, la lesiones se pueden reparar de esta forma. Un ejemplo es el fotodímero mutagénico causado por la luz UV (véase la Fig. 16-20). El fotodímero de pirimidina-ciclobutano puede repararse con una **fotoliasa** que se ha encontrado en bacterias y eucariotas inferiores, aunque no en la especie humana. La enzima se une al fotodímero y lo rompe en presencia de ciertas longitudes de onda de luz visible, regenerando las bases originales (Fig. 16-25). Esta enzima no puede operar en la oscuridad, así que en esta condición se necesitan otros mecanismos de reparación para eliminar el daño producido por la luz UV. En moscas y *Drosophila* se ha detectado una fotoliasa que elimina fotoproductos 6-4.

Las **transferasas de grupos alquilo** también son enzimas implicadas en la reversión directa de las lesiones. Eliminan ciertos grupos alquilo añadidos a la posición O-6 de la guanina

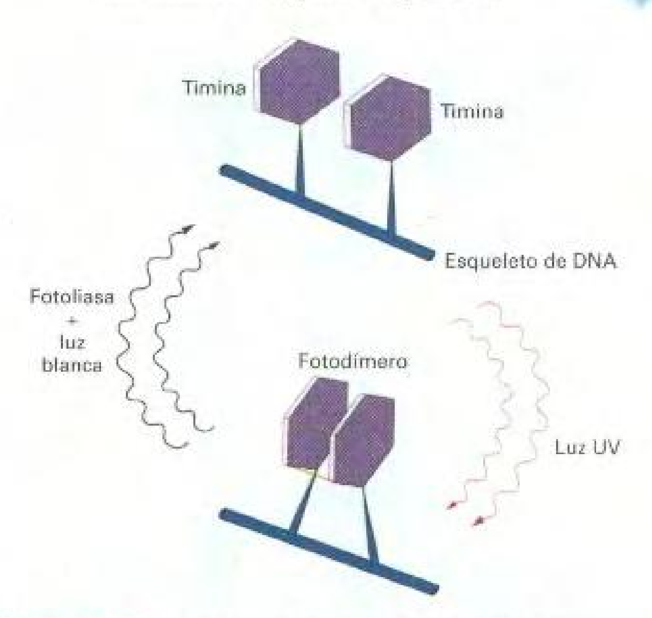


Figura 16-25. Reparación de un fotodímero de pirimidina inducido por luz UV mediante una enzima fotorreactivante o fotoliasa. La enzima reconoce el fotodímero (en este caso, un dímero de timina) y se une a él. En presencia de luz, la fotoliasa utiliza su energía para romper el dímero en sus respectivos monómeros. (Según J. D. Watson, *Molecular Biology of the Gene*, 3.ª ed. Copyright © 1976 por W. A. Benjamin.)

(Fig. 16-17) por agentes como la NG y el EMS. La transferasa de grupos metilo de *E. coli* está bien estudiada. Esta enzima transfiere el grupo metilo desde la *O*-6-metilguanina a un residuo de cisteína de la proteína. Cuando ocurre esto, la enzima se inactiva, de forma que este sistema de reparación puede saturarse si el nivel de alquilación es lo suficientemente elevado.

Vías de reparación por escisión

Reparación general por escisión. Este sistema, denominado también *reparación por escisión de nucleótidos*, implica la rotura de dos enlaces fosfodiésteres sobre la misma cadena, uno a cada lado de la lesión, lo que da lugar a la escisión de un oligonucleótido. Esta escisión deja un hueco que se rellena mediante una síntesis de reparación y queda sellado por una ligasa. En los procariotas, se eliminan 12 ó 13 nucleótidos; mientras que, en los eucariotas, se eliminan de 27 a 29 nucleótidos. La Figura 16-26 representa los patrones de incisiones en cada caso.

En *E. coli*, los productos de los genes *uvrA*, *B* y *C* constituyen la escinucleasa. La proteína UvrA, que reconoce el DNA dañado, forma un complejo con UvrB a la que conduce al sitio lesionado antes de que se produzca la disociación. A continuación, la proteína UvrC se une a la UvrB. Cada una de estas dos subunidades realiza una incisión. Un oligonucleótido corto de 12 nucleótidos queda desconectado del resto y se libera por la acción de otra proteína, la helicasa II. La Figura 16-27 muestra con detalle estos hechos de escisión.

La escinucleasa humana es considerablemente más compleja que la bacteriana e incluye al menos 17 proteínas. Sin embargo, las etapas básicas de acción son las mismas que en *E. coli*.

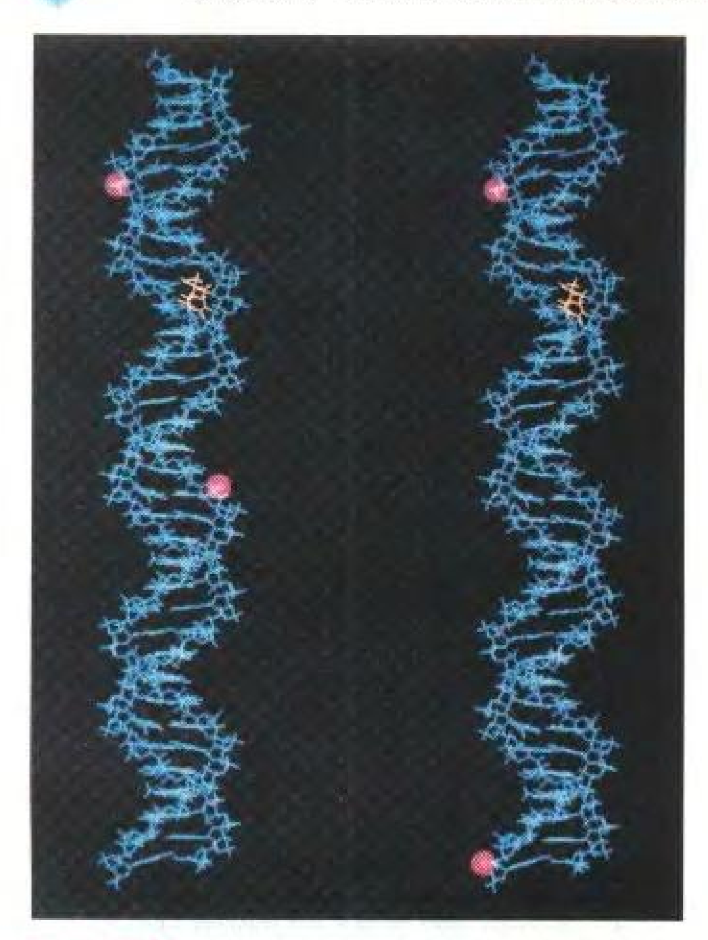


Figura 16-26. Patrones de incisión de las escinucleasas de *E. coli* (*izquierda*) y humana. Los puntos rojos indican los patrones de incisión en una lesión —en este caso, un dímero de timina— que se muestra en naranja. (Cortesía de J. E. Hearst, en A. Sancar, *Science* 266, 1974, 1954.)

Figura 16-27. Representación esquematizada de los acontecimientos que siguen a la incisión realizada por la escinucleasa UvrABC de *E. coli*. Primero la subunidad UvrA forma un complejo con la subunidad UvrB, a la que conduce al sitio dañado antes de que se produzca la disociación. A continuación, como se muestra en la figura, la helicasa de DNA II media la liberación de un segmento de DNA generado por dos incisiones en la misma cadena del DNA. La proteína UvrC es desplazada también en este momento. La síntesis de reparación subsiguiente desplaza a UvrB. (Tomado de E. C. Friedberg, G. C. Walker y W. Seide, *DNA Repair and Mutagenesis*. Copyright © 1995 de the American Society for Microbiology.)

Acoplamiento entre la transcripción y la reparación. La implicación de TFIIH, un factor de transcripción, en la reparación por escisión sirve para recalcar el hecho de que la transcripción y la reparación están acopladas. Tanto en los eucariotas como en los procariotas, hay una reparación preferente de la cadena de DNA que se transcribe en los genes que se expresan activamente. La Figura 16-28 describe un mecanismo para este acoplamiento.

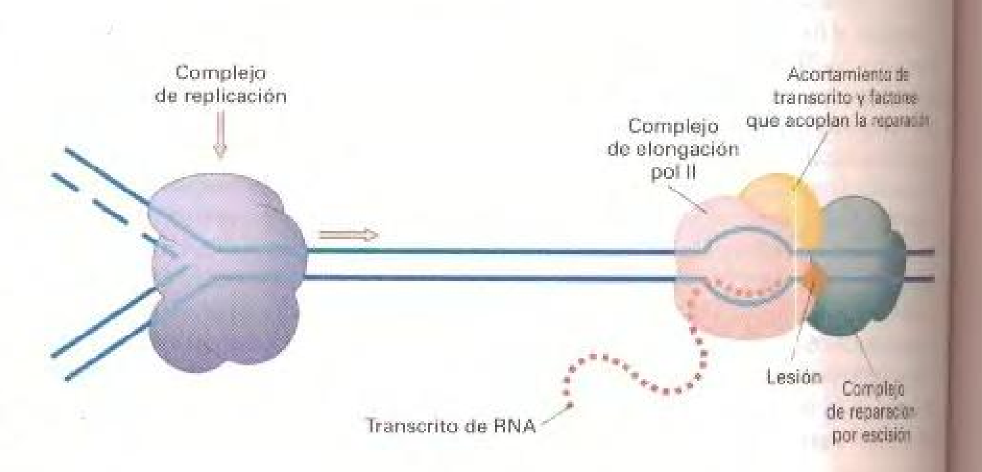


Figura 16-28. La reparación por escisión de nucleótidos está acoplada a la transcripción. Este modelo para la reparación acoplada en células de mamífero muestra la interrupción del avance de la polimerasa de RNA (rosa) cuando encuentra una lesión. La enzima sufre un cambio conformacional, que permite que se reasocien las dos cadenas del DNA en el sitio de la lesión. Factores proteicos ayudan al acoplamiento conduciendo al TFIIH y otros factores al lugar para llevar a cabo las reacciones de incisión, escisión y reparación. La transcipción puede continuar entonces con normalidad. (Tomado de P. C. Hanawalt, *Science* 266, 2994, 2957.)

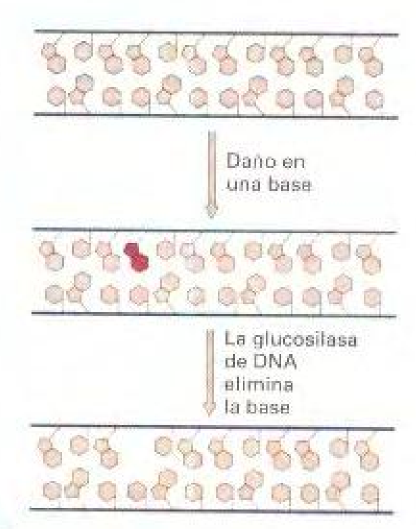


Figura 16-29. Acción de las glucosilasas del DNA. Las glucosilasas eliminan las bases alteradas dejando un sitio AP. Con posterioridad, el sitio AP es reparado por las endonucleasas AP representadas en la Figura 16-30. (Según B. Lewin, *Genes*. Copyright © 1983 de John Willey.)

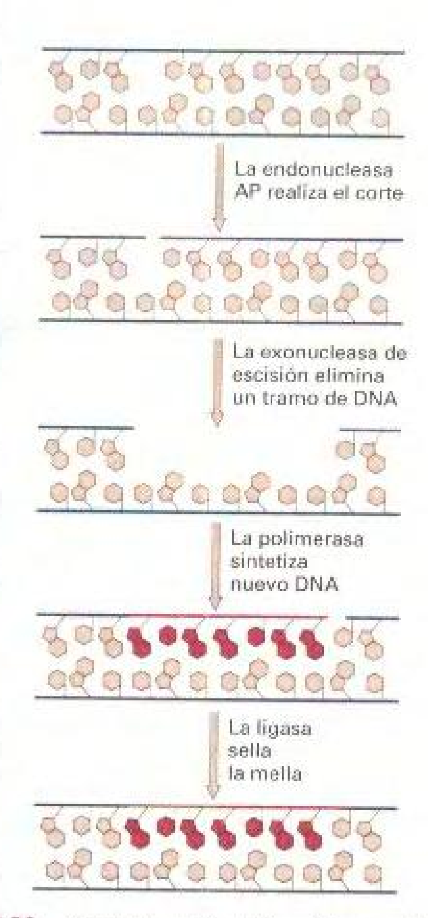


Figura 16-30. Reparación de sitios AP (apurínicos o apirimidínicos). Las endonucleasas AP reconocen los sitios AP y cortan los enlaces fosfodiésteres. Un tramo de DNA es eliminado por una exonucleasa y el hueco correspondiente se rellena por medio de la polimerasa I y la ligasa de DNA. (Según B. Lewin, *Genes*. Copyright © 1983 de John Wiley.)

Vías de escisión específicas. Ciertas lesiones son tan sutiles que no causan una distorsión lo suficientemente importante como para ser reconocidas por el sistema general de reparación por escisión determinado por los genes *uvrABC* y sus homólogos de las células superiores. Por tanto, se necesitan otras vías de reparación por escisión adicionales.

Vía de reparación mediante glucosilasas de DNA (reparación por escisión de base). Las **glucosilasas de DNA** no rompen los enlaces fosfodiésteres, sino los enlaces N-glucosídicos (base-azúcar), liberando la base alterada y generando un sitio apurínico o apirimidínico, denominados ambos como **sitios AP**, ya que son bioquímicamente equivalentes (véase la Fig. 16-7). Esta etapa inicial se muestra en la Figura 16-29. El sitio AP resultante es reparado a continuación por una vía de reparación mediada por la endonucleasa AP (que se describirá en el siguiente subapartado).

Existen numerosas glucosilasas de DNA. Una de ellas, la glucosilasa de uracilo de DNA, elimina el uracilo del DNA. Los residuos de uracilo, que se producen por la desaminación espontánea de la citosina (Fig. 16-8), pueden dar lugar a una transición C → T cuando no se reparan. Es posible que la pareja natural de la adenina en el DNA sea la timina (5-metiluracilo), y no el uracilo, para permitir el reconocimiento y la escisión de estos residuos de uracilo. Si el uracilo fuera un constituyente normal del DNA, este sistema de reparación no sería posible.

Hay también una glucosilasa que reconoce y escinde la hipoxantina, el producto de la desaminación de la adenina. Otras glucosilasas eliminan bases alquiladas (como la 3–metiladenina, la 3–metilguanina y la 7-metilguanina), purinas con anillos abiertos, bases dañadas oxidativamente y, en algunos organismos, fotodímeros producidos por la luz UV. Todavía se siguen descubriendo nuevas glucosilasas.

Vía de reparación mediante la nucleasa AP. Todas las células contienen endonucleasas que atacan los sitios que quedan tras la pérdida espontánea de residuos de purina o pirimidina. Las **endonucleasas AP** resultan vitales para la célula ya que, como se apuntó con anterioridad, la despurinización espontánea es un hecho relativamente frecuente. Estas enzimas introducen hendiduras en la cadena mediante la rotura de enlaces fosfodiésteres en los sitios AP. Esto promueve un proceso de reparación por escisión mediado por tres enzimas adicionales: una exonucleasa, la polimerasa de DNA I y la ligasa de DNA (Fig. 16-30).

Dada la eficacia de la ruta de reparación por la endonucleasa AP, ésta puede ser la etapa final de otras vías de reparación. De esta manera, si los pares de bases dañados son escindidos, dejando un sitio AP, las endonucleasas AP pueden completar el restablecimiento de la constitución silvestre. Esto es lo que ocurre en la vía de reparación por glucosilasas de DNA.

El sistema GO. Dos glucosilasas, los productos de los genes *mutM* y *mutY*, actúan conjuntamente para eliminar las mutaciones causadas por las lesiones producidas en el DNA por el 8-oxodG, o GO (véase la Fig. 16-10). Estas glucosilasas, junto al producto del gen *mutT* mencionado anteriormente, forman el sistema GO. Cuando se generan lesiones GO en el DNA, por daño oxidativo espontáneo, una glucosilasa determinada por *mutM* elimina la lesión (Fig. 16-31). Aun así, persisten algunas lesiones GO que

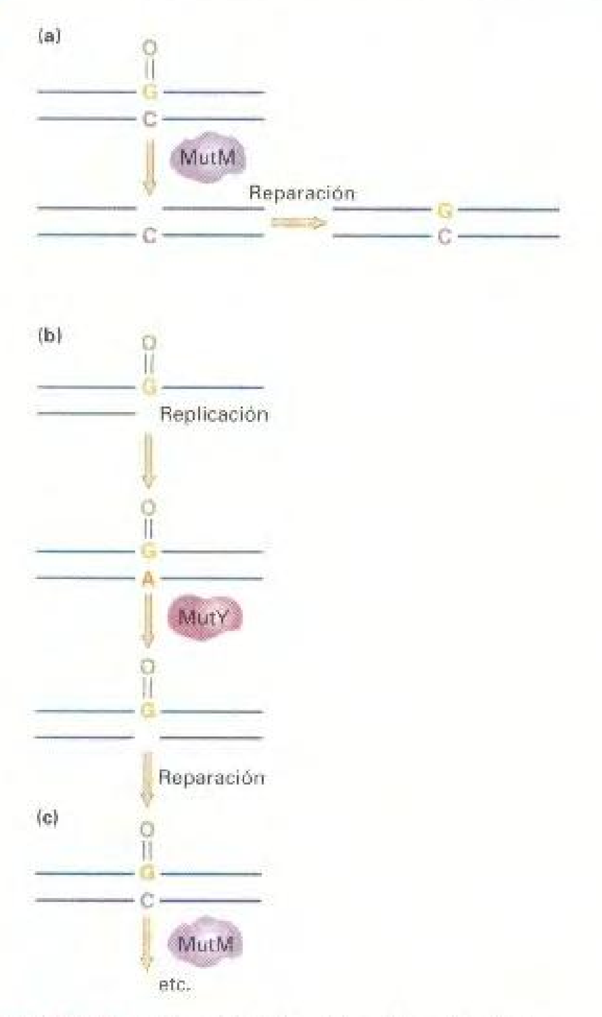


Figura 16-31. Sistema GO. (a) Las lesiones 8-oxodG se eliminan mediante la acción de la proteína MutM, dejando un sitio AP que es reparado por endonucleasas y síntesis de reparación. (b) Sin embargo, cuando se facilita que las polimerasas que intervienen en la replicación operen frente a la lesión, generalmente añaden un residuo de A. Este emparejamiento erróneo daría lugar al cambio GC → TA, pero la proteína MutY elimina la A, permitiendo la reparación del sitio AP resultante. (c) Cuando las polimerasas de reparación operan frente a la lesión 8-oxodG, restauran con preferencia una C frente a ésta, dando otra oportunidad a la proteína MutM para eliminar la lesión.

emparejan erróneamente con la adenina. Una segunda glucosilasa, el producto del gen *mutY*, elimina la adenina de este emparejamiento erróneo específico, llevando al restablecimiento de la citosina correcta mediante síntesis de reparación (mediada por la polimerasa de DNA I) y permitiendo la subsiguiente eliminación de la lesión GO por el producto del gen *mutM*.

El producto del gen *mutT* impide la incorporación de GO frente a la adenina. Se han detectado los genes humanos homólogos a los *mutT*, *mutY* y *mutM*.

Reparación posterior a la replicación

Reparación de emparejamientos erróneos. Algunas vías de reparación pueden reconocer errores incluso después de que haya tenido lugar la replicación. Uno de estos sistemas, denominado **sistema de reparación de emparejamientos erróneos** detecta los emparejamientos erróneos que se producen durante la replicación. Suponga que tuviera que diseñar un sistema enzimático que pudiera reparar errores de la replicación. ¿Qué debería ser capaz de hacer este sistema? Al menos tres cosas:

1. Reconocer pares de bases mal emparejadas.
2. Determinar cuál de las dos bases del emparejamiento erróneo es la incorrecta.
3. Escindir la base incorrecta y realizar la síntesis de reparación.

El segundo punto es la propiedad más importante de dicho sistema. A menos que fuera capaz de discriminar entre la base correcta y la incorrecta, el sistema de reparación de emparejamientos erróneos no podría determinar la base que debe ser escindida. Por ejemplo, si se produce un emparejamiento erróneo G–T como resultado de un error en la replicación, ¿cómo podría determinar el sistema si la base incorrecta es la G o la T? Ambas

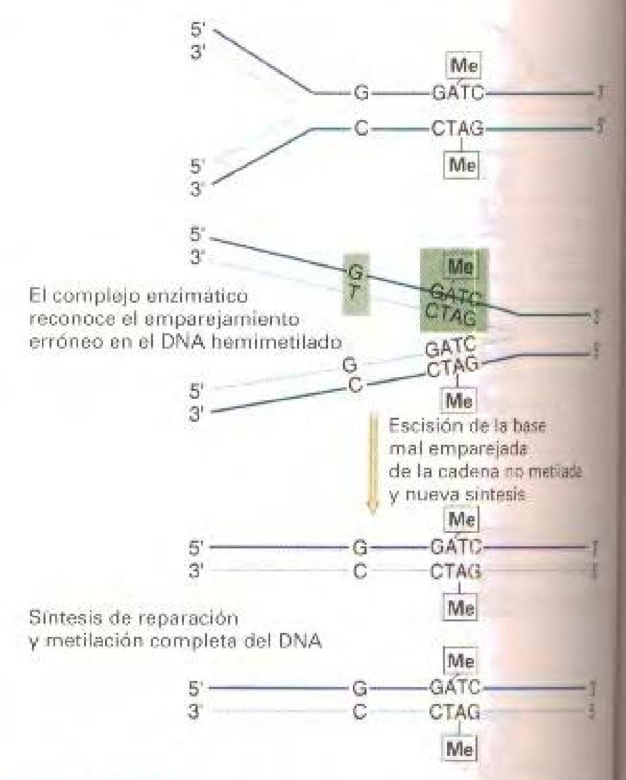
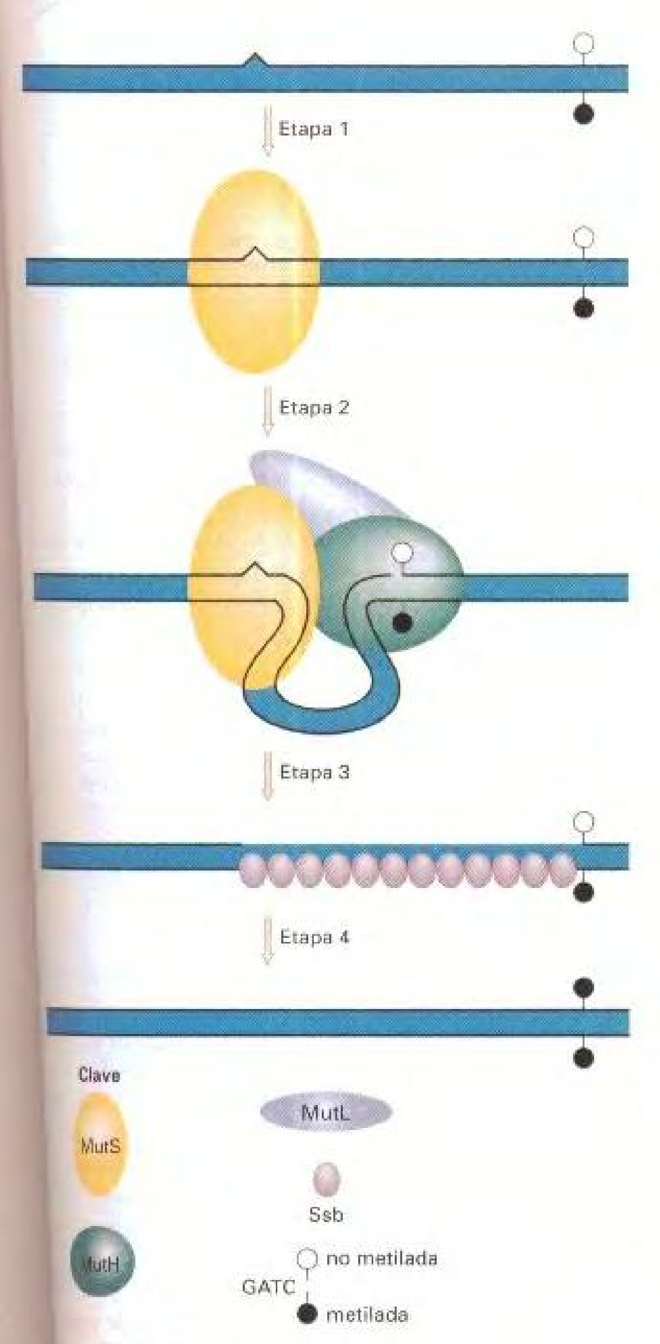


Figura 16-32. Modelo para la reparación de emparejamientos erróneos en *E. coli*. Puesto que el DNA se metila mediante reacciones enzimáticas que reconocen la A de una secuencia GATC, la cadena recién sintetizada no estará metilada inmediatamente después de la replicación del DNA. El DNA de doble cadena *hemimetilado* sirve como punto de reconocimiento para el sistema de reparación de emparejamientos erróneos, permitiéndole discriminar entre la cadena vieja y la nueva. La figura muestra un emparejamiento erróneo G—T. El sistema de reparación de emparejamientos erróneos reconoce estos nucleótidos mal emparejados y se une a ellos, determina la cadena correcta (la vieja) por ser la que está metilada en el DNA de doble cadena hemimetilado y, a continuación, escinde la base incorrecta de la cadena recién sintetizada. El sistema de síntesis de reparación restaura el par de bases normal. (Según E. C. Friedberg, *DNA Repair*. Copyright © 1985 de W. H. Freeman and Company.)

son bases normales del DNA. Sin embargo, los errores en la replicación se producen por la incorporación errónea de bases en la cadena recién sintetizada, de modo que es la base de esta cadena la que debe ser reconocida y escindida.

Para reconocer la cadena vieja, molde de la cadena recién sintetizada, el sistema de reparación de emparejamientos erróneos



ura 16-33. Etapas en la reparación de emparejamientos erróneos ...). (1) MutS se une a los nucleótidos mal emparejados. (2) MutH y MutL ... complejo. MutH corta la cadena recién sintetizada (no metilada) ...nucleasa de degradación atraviesa el sitio del emparejamiento ...dejando un tramo pequeño de cadena sencilla. (3) La proteína de ... cadena sencilla (Ssb) protege la región de cadena sencilla. (4) La síntesis ...ración y la ligación rellenan el hueco. (Tomado de J. Jiricny, *Trends* ..., Vol. 10. Elsevier Trends Journals, Cambridge, UK, 1995.)

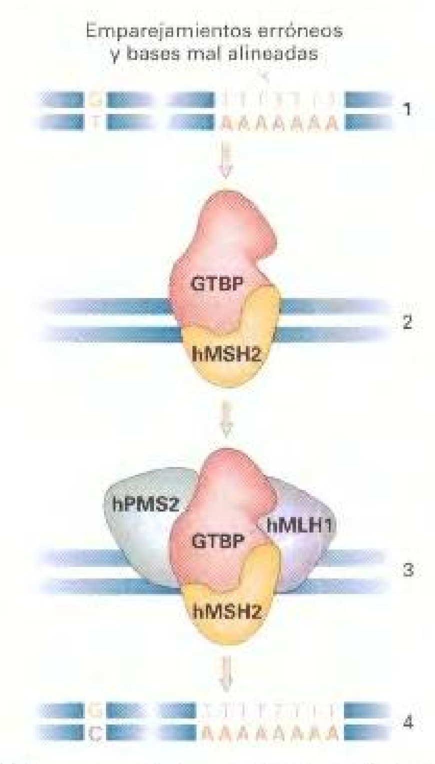


Figura 16-34. Reparación de emparejamientos erróneos en la especie humana. (1) Los emparejamientos erróneos y las bases mal alineadas aparecen durante la replicación. (2) La proteína de unión a G—T (GTBP) y la proteína humana homóloga a MutS (hMSH2) reconocen los emparejamientos incorrectos. (3) Dos proteínas adicionales, hPMS2 y hMLH1, se incorporan para formar un complejo de reparación de mayor tamaño. (4) El emparejamiento erróneo se repara después de la eliminación del DNA, la síntesis de reparación y la ligación. (Tomado de P. Karran, *Science* 268, 1995, 1857.)

de las bacterias aprovecha el retraso normal en la metilación posterior a la replicación de la secuencia

$$5'\text{—G—A—T—C—}3'$$
$$3'\text{—C—T—A—G—}5'$$

La enzima metiladora es la **metilasa de adenina**, que produce 6-metiladenina en cada una de las cadenas. No obstante, la enzima tarda varios minutos en reconocer y modificar las secuencias GATC recién sintetizadas. El sistema de reparación de emparejamientos erróneos actúa durante ese período de tiempo, ya que puede distinguir las cadenas viejas de las nuevas por el patrón de metilación. La metilación de la posición 6 de la adenina no afecta al emparejamiento de las bases, aunque proporciona una etiqueta apropiada que puede ser detectada por otros sistemas enzimáticos. La Figura 16-32 muestra la horquilla de replicación durante la corrección de emparejamientos erróneos. Observe que inmediatamente después de tener lugar la replicación, la única cadena que está metilada en las secuencias GATC es la vieja.

Una vez que se ha identificado el sitio mal emparejado, el sistema de reparación de emparejamientos erróneos corrige el error. La Figura 16-33 ilustra un modelo para explicar cómo el sistema de reparación lleva a cabo la corrección en *E. coli*.

El sistema de corrección de emparejamientos erróneos se ha caracterizado también en la especie humana. Dos de las proteí-

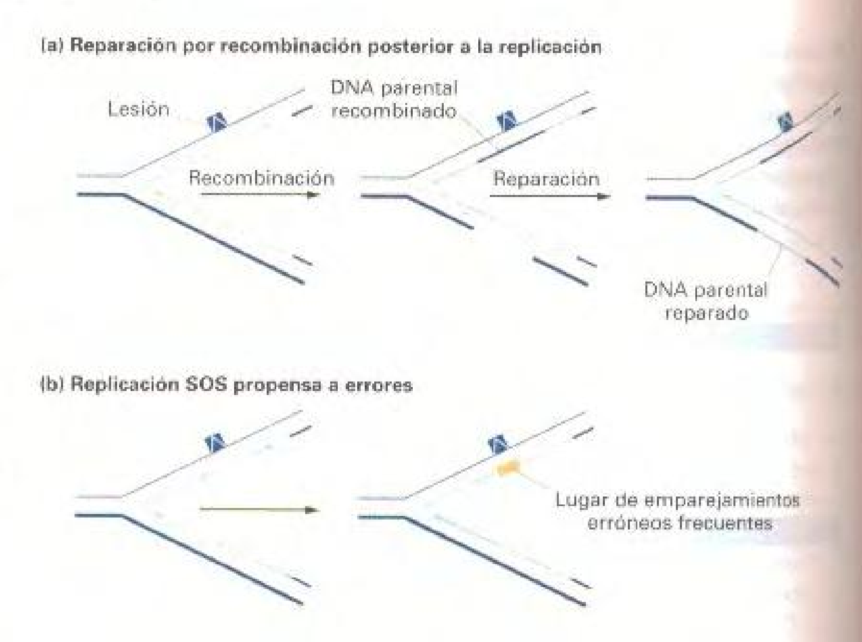


Figura 16-35. Esquema de la reparación posterior a la replicación. (a) En la reparación por recombinación, la replicación salta sobre una lesión bloqueadora, dejando un hueco en la nueva cadena. Una proteína dependiente de *recA* rellena luego el hueco, empleando una porción de la cadena parental opuesta (gracias a la complementariedad del DNA, el hueco se rellena con las bases correctas). Finalmente, la proteína RecA repara el hueco en la cadena parental. (b) En el sistema SOS, cuando el aparato de replicación alcanza una lesión bloqueadora, el sistema de reparación inserta directamente el número necesario de bases (a menudo incorrectas) frente a la lesión y la replicación continúa sin dejar ningún hueco. Observe que, en cualquiera de las dos vías, la lesión bloqueadora original permanece en el DNA y debe repararse mediante alguna otra vía. (Tomado de A. Kornberg y T. Baker, *DNA Replication*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de W. H. Freeman and Company.)

nas, hMSH2 y hMLH1, son muy similares a las bacterianas MutS y MutL, respectivamente. La Figura 16-34 representa cómo la proteína hMSH2, junto a la proteína de unión a G—T (GTBP, del inglés *G—T Binding Protein*), reconoce las bases mal emparejadas y favorece la unión de los otros componentes del sistema, hPMS2 y hMLH1, para llevar a cabo la reparación del emparejamiento erróneo.

Reparación por recombinación. El gen *recA*, implicado en el sistema SOS (Fig. 16-19), también lo está en la reparación posterior a la replicación. En este caso, el sistema de replicación del DNA se detiene en un fotodímero producido por la luz UV o en otra lesión que lo bloquea y, a continuación, vuelve a empezar una vez pasado el bloqueo, dejando un hueco de cadena sencilla. En la reparación por recombinación, este hueco se remienda con DNA cortado de la molécula hermana (Fig. 16-35*a*). Este proceso parece provocar pocos errores. Por el contrario, como se describió antes, el sistema SOS es muy mutagénico. En este caso, el sistema de replicación permanece sobre la lesión (Figs. 16-19 y 16-35*b*), aceptando nucleótidos no complementarios para la síntesis de la nueva cadena.

La estrategia de la reparación

Ahora podemos apreciar la estrategia global del sistema de reparación de las células. El Cuadro 16-2 resume los muchos sistemas de reparación distintos que emplean las células. Sería útil que pudieran utilizarse enzimas que eliminaran directamente cada lesión específica. Sin embargo, a veces, no resulta químicamente posible, y tampoco es factible anticipar todos los tipos posibles de daños que puede sufrir el DNA. Por lo tanto, se utiliza un sistema general de reparación por escisión para eliminar cualquier base dañada que origine una distorsión reconocible en la doble hélice. Cuando las lesiones son demasiado sutiles para causar tal distorsión, se diseñan sistemas específicos de escisión, glucosilasas o sistemas de eliminación. Para eliminar los errores en la replicación, actúa un sistema de reparación de emparejamientos erróneos posterior a la replicación; finalmente, existen sistemas de recombinación, también posteriores a la replicación, que eliminan los huecos situados frente a lesiones bloqueadoras que han escapado a los otros sistemas de reparación.

En respuesta a la lesión se inducen diversas rutas de reparación, como el sistema SOS (véase la Fig. 16-19), y se comentaron anteriormente muchas de las proteínas que participan en la reparación de la lesión por alquilación.

COROLARIO

Las enzimas de reparación desempeñan una función crucial en la reducción de las lesiones genéticas de las células vivas. La célula tiene muchas vías de reparación distintas a su disposición para eliminar errores potencialmente mutagénicos.

Mutadores

Como indica la descripción anterior de los procesos de reparación, las células normales están programadas para evitar los errores. Los procesos de reparación son tan eficaces que la tasa observada de sustitución de bases es de tan sólo 10^{-10} a 10^{-9} por par de bases, por célula y por generación en *E. coli*. Sin embargo, se han detectado estirpes mutantes que presentan tasas de mutación elevadas. Tales estirpes se denominan **mutadoras**. En muchos casos, el fenotipo mutador se debe a un sistema de reparación defectuoso. En la especie humana, estos defectos de reparación suelen producir enfermedades graves.

En *E. coli*, los loci mutadores *mutH*, *mutL*, *mutU* y *mutS* afectan a los componentes del sistema de reparación de emparejamientos erróneos posterior a la replicación (véase la Fig. 16-33), al igual que el locus *dam*, que determina la enzima metilasa de desoxiadenosina. Las estirpes Dam^- no pueden metilar las secuencias GATC (véase la Fig. 16-32), de manera que el sistema de reparación no puede discriminar entre la cadena molde y la recién sintetizada. Esto conduce a una tasa de mutación más elevada de lo normal.

CUADRO 16-2. Sistemas de reparación en *E. coli*

Modo general de funcionamiento	Ejemplo	Tipo de lesión reparada	Mecanismo
Detoxificación	Dismutasa del superóxido	Impide la formación de la lesión oxidativa	Convierte los superóxidos en peróxido de hidrógeno, que es neutralizado por la catalasa
Eliminación directa de lesiones	Transferasas de grupos alquilo	*O*-6-alquilguanina	Transfiere el grupo alquilo desde la *O*-6-alquilguanina a un residuo de cisteína de la transferasa
	Fotoliasa	Fotoproducto 6-4	Rompe el enlace 6-4 y restaura las bases a sus condiciones normales
	Fotoliasa	Fotodímeros de luz UV	Rompe los dímeros en presencia de luz blanca
Escisión general	Sistema exonucleósico determinado por *uvrABC*	Lesiones que causan distorsiones en la doble hélice, como los fotoproductos de la luz UV y las adiciones químicas voluminosas	Realiza cortes endonucleolíticos a cada lado de la lesión; el hueco resultante es reparado con la polimerasa de DNA I y la ligasa de DNA
Escisión específica	Endonucleasas AP	Sitios AP	Realiza cortes endonucleolíticos; la exonucleasa forma un hueco que es reparado con la polimerasa de DNA I y la ligasa de DNA
	Glucosilasas de DNA	Bases desaminadas (uracilo, hipoxantina), ciertas bases metiladas, purinas con anillos abiertos, bases dañadas oxidativamente y otras bases modificadas	Elimina la base, originando un sitio AP que es reparado por endonucleasas AP
	Sistema GO	8-oxodG	Una glucosilasa elimina el 8-oxodG del DNA. Otra glucosilasa elimina la A de los emparejamientos erróneos 8-oxodG—A, lo que conlleva la formación de un par 8-oxodG—C, y luego la primera glucosilasa elimina el 8-oxodG
Posterior a la replicación	Sistema de reparación de emparejamientos erróneos	Errores en la replicación que dan lugar a emparejamientos erróneos de pares de bases	Reconoce la cadena recién sintetizada mediante la detección de residuos de adenina no metilados en las secuencias 5'-GATC-3', y escinde bases de la cadena recién sintetitazada cuando detecta un emparejamiento erróneo
	Reparación por recombinación	Lesiones que bloquean la replicación y dan lugar a huecos de cadena sencilla	Intercambio por recombinación
	Sistema SOS	Lesiones que bloquean la replicación	Permite la replicación frente al sitio de la lesión bloqueadora, dando lugar a mutaciones frecuentes en esta posición

Las mutaciones en el locus *mutY* provocan transversiones GC → TA, ya que muchos emparejamientos erróneos G—A y de los 8-oxodG-A quedan sin ser reparados (véase el sistema GO descrito anteriormente). El gen *mutM* determina una glucosilasa que elimina el 8-oxodG. Las estirpes que carecen de *mutM* son mutadoras para las transversiones GC → TA. Las estirpes MutT⁻ tienen tasas elevadas de transversión AT → CG, puesto que carecen de la actividad que impide la incorporación de 8-oxodG frente a la adenina.

Las estirpes Ung⁻ carecen de la enzima glucosilasa de uracilo de DNA. Estas estirpes no pueden escindir el uracilo que resulta de la desaminación de la citosina y, en consecuencia, presentan

CUADRO 16-3. Enfermedades humanas asociadas a defectos en los sistemas de reparación del DNA

Enfermedad	Sensibilidad	Susceptibilidad al cáncer	Grupos de complementación	Síntomas
Ataxia telangiectasia	Radiación γ	Linfomas	5	Ataxia, dilatación de los vasos sanguíneos (telangiectasia) en la piel y los ojos, aberraciones cromosómicas, disfunción del sistema inmunitario
Síndrome de Bloom	Agentes alquilantes suaves	Carcinomas, leucemias y linfomas	1	Fotosensibilidad, telangiectasia facial, alteraciones cromosómicas
Síndrome de Cockayne	Luz UV		2	Enanismo, atrofia de la retina, fotosensibilidad, progeria, sordera, trisomía del cromosoma 10
Anemia de Fanconi	Agentes enlazantes de cadenas	Leucemias	3	Pancitopenia hipoplásica, anomalías congénitas
Xeroderma pigmentosum	Luz UV, mutágenos químicos	Carcinomas de piel y melanomas	8	Fotosensibilidad en la piel y los ojos, queratosis
HNPCC		Colon, ovario	4	Formación temprana de tumores

Nota: otras enfermedades hereditarias humanas que pueden estar relacionadas con defectos en los sistemas de reparación del DNA son la disqueratosis congénita (síndrome de Zinsser-Cole Engman) y la tricotiodistrofia.
HNPCC, cáncer colorrectal hereditario sin poliposis.
Fuente: A. Kornberg y T. Baker, *DNA Replication*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de W. H. Freeman and Company.

niveles elevados de transiciones C → T. El locus *mutD* es responsable de una tasa muy alta de mutación (al menos tres órdenes de magnitud más alta de lo normal). Las mutaciones en este locus alteran la función correctora de la polimerasa de DNA III (Cap. 8).

Figura 16-36. Cáncer de piel en un caso de xerodermia pigmentosa (XP). Esta enfermedad hereditaria recesiva se debe a la carencia de una de las enzimas de reparación por escisión, que provoca la formación de cánceres de piel por la exposición de ésta a la radiación UV de la luz solar. (Fotografía cortesía de Dirk Bootsma, Erasmus University, Rotterdam.)

Defectos en los sistemas de reparación y enfermedades humanas

Se sabe en unos casos o se sospecha en otros que varias enfermedades genéticas humanas están relacionadas con defectos en los sistemas de reparación. Estos defectos conducen a menudo a una elevada incidencia de cáncer. El Cuadro 16-3 resume la información sobre estas enfermedades, que generalmente son autosómicas recesivas. Describiremos dos ejemplos.

La **xerodermia pigmentosa (XP)** se debe a un defecto en cualquiera de los genes (grupos de complementación) implica-

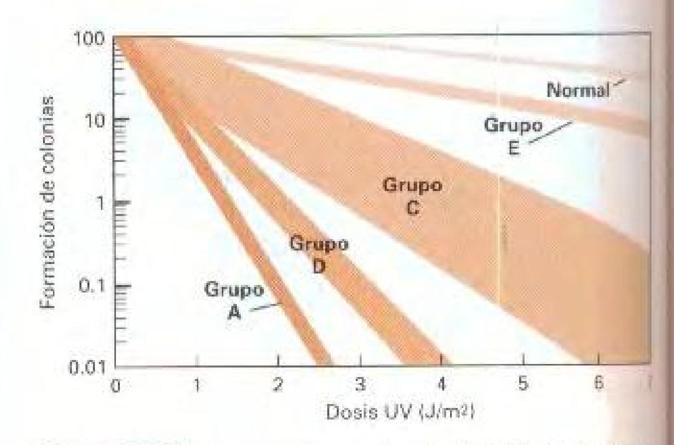


Figura 16-37. Hipersensibilidad a la radiación UV de células cultivadas afectadas de XP. La figura muestra células de varios grupos de complementación implicados en la XP. Se observa variación entre los grupos de complementación, aunque todos son más sensibles a la luz UV que las células normales. (Según J. E. Cleaver y K. H. Kraemer, Xeroderma pigmentosum, de C. R. Scriver et al., eds., *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Copyright © 19[illegible] de McGraw-Hill Book Co., New York.)

...os en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (véanse las Figs. 16-27 y 16-28). Las personas afectadas por esta dolencia presentan una tendencia extraordinariamente elevada a sufrir cánceres de piel inducidos por la luz UV (Fig. 16-36), como resultado de la exposición a los rayos del sol; y, con frecuencia, presentan anomalías neurológicas. La diferencia en la fotosensibilidad entre las células normales y las enfermas se evidencia en las curvas de supervivencia de la Figura 16-37.

El **cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC**, del inglés *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) es una de las predisposiciones hereditarias al cáncer más comunes, que afecta a 1 de cada 200 personas en el mundo occidental. Los estudios han demostrado que este síndrome se debe a la pérdida del sistema de reparación de emparejamientos erróneos. La mayor parte del HNPCC está producido por un defecto en los genes que determinan las homólogas humanas de las proteínas bacterianas MutS y MutL (véase la Fig. 16-34). La herencia del HNPCC es autosómica dominante. Las células con una copia funcional de los genes del sistema de reparación de emparejamientos erróneos tienen una actividad normal de reparación, pero las células tumorales derivan de las células que han perdido la única copia funcional y, por lo tanto, son deficitarias en la reparación de los emparejamientos erróneos. Estas células presentan tasas de mutación elevadas que, con el tiempo, resultan en el desarrollo y proliferación de un tumor.

RESUMEN

Las mutaciones génicas pueden surgir mediante muchos procesos distintos. Las mutaciones espontáneas son resultado de errores en la replicación o de lesiones espontáneas, como las originadas por desaminaciones o despurinizaciones. (La recombinación y los elementos genéticos transponibles también pueden dar lugar a la alteración de genes, como se describe en los Caps. 19 y 20). Los mutágenos aumentan la frecuencia de mutación. Algunos de estos agentes actúan imitando una base y emparejando luego erróneamente durante la replicación del DNA. Otros alteran las bases del DNA y las transforman en derivados que no se emparejan correctamente. Una tercera clase de mutágenos, que incluye a la mayoría de los carcinógenos, daña al DNA de manera que se produce un bloqueo en la replicación. Se requiere la activación de una vía enzimática, denominada sistema SOS, para realizar la replicación en zonas en las que hay lesiones que la bloquean, dando lugar a mutaciones frente a la lesión bloqueadora.

Los estudios moleculares de la mutagénesis en bacterias han conducido a la identificación de agentes que provocan cáncer en la especie humana. La secuenciación realizada en mutaciones de genes supresores de tumores en pacientes con cáncer de hígado o de piel ha permitido la identificación de cambios muy parecidos a los cambios mutacionales característicos causados por mutágenos bacterianos específicos.

Nuestro conocimiento de la base molecular de la mutación puede explotarse con propósitos útiles. Un ejemplo es el test de Ames, que utiliza estirpes bacterianas mutantes para comprobar la actividad mutagénica de los compuestos del medio ambiente. Dada la correlación entre mutagenicidad y carcinogenicidad, este rápido ensayo permite la identificación de carcinógenos potenciales presentes en el medio que nos rodea.

Las enzimas de reparación presentes en las células vivas minimizan enormemente el daño genético, evitando así muchas mutaciones. Los organismos mutantes que carecen de ciertas enzimas de reparación muestran tasas de mutación más altas de lo normal. En la especie humana, los defectos en los sistemas de reparación son la causa de una variedad de enfermedades y de una mayor susceptibilidad al cáncer.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

mutación / auxótrofo / transición / cambio de fase / transversión / mutágeno / fotorreactivación / mutador / SOS / enfermedad genética / aminoácido

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

En el Capítulo 10, aprendimos que los codones ámbar y ocre son dos de los tripletes sin sentido terminadores de la traducción. Basándose en la especificidad mutagénica de la aflatoxina B₁ y el metanosulfonato de etilo (EMS), describa si cada uno de estos mutágenos podría revertir los codones ámbar (UAG) y ocre (UAA) a la forma silvestre.

♦ Solución ♦

El EMS induce fundamentalmente transiciones GC → AT. Los codones UAG no podrían revertir al tipo silvestre, puesto que el EMS sólo estimularía el cambio UAG → UAA, lo que originaría otro codón sin sentido (ocre). El EMS no actuaría sobre los co-

dones UAA. La aflatoxina B_1 induce principalmente transversiones GC → TA. Sólo actuaría sobre la tercera posición de los codones UAG, produciendo (a nivel de mRNA) un cambio UAG → UAU, que da lugar a tirosina. Por lo tanto, si la tirosina fuera un aminoácido aceptable en la posición correspondiente de la proteína, la aflatoxina B_1 podría revertir los codones UAG. La aflatoxina B_1 no revertiría los codones UAA, porque no hay pares G—C en la posición correspondiente del DNA.

Problemas Resueltos

1. Un mutante de *E. coli* es muy resistente a la mutagénesis con una diversidad de agentes, que incluyen la luz ultravioleta, la aflatoxina B_1 y el benzo(a)pireno. Explique una causa posible de este fenotipo mutante.

♦ Solución ♦

El mutante podría carecer del sistema SOS y quizá ser defectuoso en el gen *umuC*. Tales estirpes no podrían evitar las lesiones que bloquean la replicación producidas por los tres mutágenos indicados. Sin el procesamiento de las lesiones premutacionales no se obtendrían células viables mutadas.

Problemas

1. La secuencia continua mostrada abajo, que no tiene por qué ser necesariamente traducida, corresponde a una de las dos cadenas del DNA de una región genética. Encuentre a nivel del DNA las mutaciones espontáneas (sin la contribución de mutágenos) que esperaría que aparecieran en esta secuencia con una mayor frecuencia. Explique qué es cada mutación y por qué sería frecuente.

AAGGCTAGCTTTAGGAGATCCCG
ATCTCAAAGCTATCTAGCTTTAGG
TATATAGATCTATGCTCTCTGATC
TAGCATCCCTAGCATCATATCGGG
ATCCTACGAATCTTTGATCGGTAT
CGGGATACGTATGAAGGCTAGCC
TCATCCATCCATCCAAGCTTAATA
TCGATCGGATCCTGGAATTGGATT
CCCAGAGATCTTTTTAGCTAGCTC
CCGCCTAGCTTTCGGAGCTTAATC
CTAATGAGCAACCACCGGTATATA
GCCAATACAAGCCGGATTCGGGA
TCCTTAGGATCCAAGAATCTTCGA
GAAATCGGATCGGGATCTTATCGT
CTCCAAGAATCTCCTAGTTCCAAT
CTTTATCGGATCGGAAGGCTAT

(Problema 1 tomado de *Discovering Molecular Genetics*, de Jeffrey H. Miller, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1996.)

2. Describa el modelo de Streisinger para la formación de cambios de fase. Demuestre cómo puede explicar este modelo los puntos calientes mutacionales en el gen *lacI* de *E. coli*.

3. Haga un diagrama de dos mecanismos distintos de aparición de deleciones. ¿Por qué los experimentos de secuenciación de DNA sugieren estas posibilidades?

4. Las bases del DNA de *Escherichia classicus* se denominan como las notas musicales, A, B, C y E. En este caso, A empareja con E, y B lo hace con C. Así, en la doble cadena del DNA, encontramos pares de bases A—E y pares de bases B—C.

Dispone de las ocho secuencias siguientes, leídas desde el 5' al 3'. En los ocho casos, sólo se indica una cadena del DNA; de manera que, en las ocho secuencias, la segunda línea es la continuación de la primera.

(1) ABBECEAABBCBBACCBCBAA
CABACCCABAEACBEAACAEBEBB
CEBACAEECAAECEC

(2) BCEECAACABCECBAECBECEB
CEEABCAACCBEBABCBBEABCAE
ACEBAEEABBEACB

(3) BBECAAACBACBECABCEAAB
CBECBCACCEECABBEAAABAEAC
AEAECBECBACBAEA

(4) ACCAEACBBBCEEABAECBACC
CBACCCBACCCBACCCBACCCEBC
AACBAEABCEBAEC

(5) CCBECEEBAAECEEABBCEABC
EBCABAECAEBBCBAAEBACCBEB
EACCBAEBCEAECA

(6) BCEAAEECABBEBCECCAECAA
BCBBCEECBACAECCECBCEAAEE
CABBEBCCAE

(7) AAECBBABCCEBACBCEAEBEE
AECCACECBEAECACBBEAACBAA
CEBCEACAEBBCCE

(8) BBEACCABACAEBEACAACBEE
CEABCEBAECCEABBEABCECCAB
CCBEAAEACEBCEC

a. ¿Cuál de las ocho secuencias tendría el punto caliente más activo para la aparición de cambios de fase?

b. ¿Cuál de las ocho secuencias tendría el punto caliente más activo para la aparición de deleciones mayores de unas pocas bases?

5. Suponga que se analiza un organismo del espacio exterior, encontrándose que su DNA tiene seis bases, J, K, L, M, P y Q. Estas bases muestran emparejamientos específicos; de manera que, en la doble hélice, J empareja con K (J—K), L lo hace con M (L—M) y P con Q (P—Q).

a. Escriba una secuencia con más de 30 bases de una sola cadena de este DNA, inserte un punto caliente para mutaciones pequeñas (de sólo unas pocas bases o menos) y explique por qué esa secuencia sería un punto caliente respecto a otras.

b. Si tuviera que diseñar con estas seis bases un gen de 1000 pares de bases, indique los principios que tendría en cuenta para impedir que las deleciones de diferentes porciones del gen aparezcan con una frecuencia elevada. Se consideran no sólo las deleciones pequeñas, sino también las grandes (mayores de 50 pares de bases).

6. Describa dos lesiones espontáneas que pueden dar lugar a mutaciones.

7. Compare el mecanismo de acción del 5-bromouracilo (5-BU) con el del metanosulfonato de etilo (EMS) en la producción de mutaciones. Explique la especificidad mutagénica de cada agente en función del mecanismo propuesto.

8. Rellene la tabla siguiente, empleando un signo más (+) para expresar que la lesión mutagénica (el daño en la base) induce el cambio de base indicado y un signo menos (−) para expresar que no lo hace.

	LESIÓN		
Cambio de bases	O^{6}-metilG	8-OxodG	Fotodímero C—C
AT → GC			
GC → TA			
GC → AT			

9. Compare los dos sistemas diferentes implicados en la reparación de sitios AP y en la eliminación de los productos de adición química.

10. Describa los sistemas de reparación que operan tras la replicación.

11. Los mutantes auxótrofos normales (extremos) no crecen en absoluto en ausencia del enriquecimiento apropiado del medio. Sin embargo, en las búsquedas de mutantes auxótrofos, es común encontrar algunos mutantes (denominados *rezumantes*) que crecen muy lentamente en ausencia del enriquecimiento apropiado y de forma normal en su presencia. Proponga una explicación sobre la naturaleza molecular de los mutantes rezumantes.

12. La estirpe A de *Neurospora* contiene la mutación *ad-3*, que revierte espontáneamente con una frecuencia de 10^{-6}. Se cruza la estirpe A con una silvestre recién aislada y se recogen las estirpes descendientes de fenotipo Ad-3. Cuando se examinaron 28 de ellas, se encontró que 13 líneas revirtieron con una tasa de 10^{-6}, mientras que las restantes 15 líneas lo hicieron con una tasa de 10^{-3}. Proponga una hipótesis que explique estos resultados y diseñe un programa experimental para someterla a comprobación.

13. **a.** ¿Por qué resulta imposible inducir mutaciones sin sentido (representadas en el mRNA por los tripletes UAG, UAA y UGA) mediante el tratamiento de estirpes silvestres con mutágenos que causan únicamente transiciones AT → GC en el DNA?

b. La hidroxilamina (HA) origina sólo transiciones GC→AT en el DNA. ¿Producirá la HA mutaciones sin sentido en estirpes silvestres?

c. ¿Revertirá el tratamiento con HA mutaciones sin sentido?

14. Se tratan varios mutantes auxótrofos de *Neurospora* con varios agentes para analizar si se produce reversión. Se obtuvieron los resultados siguientes (un signo más indica reversión):

Mutante	5-BU	HA	Proflavina	Reversión espontánea
1	−	−	−	−
2	−	−	+	+
3	+	−	−	+
4	−	−	−	+
5	+	+	−	+

a. Describa la naturaleza molecular de la mutación original (no de la reversión) para cada uno de los cinco mutantes. Sea lo más concreto posible.

b. Indique para cada uno de los cinco mutantes un posible mutágeno que pudiera haber causado la mutación original. (Una mutación espontánea no es una respuesta aceptable).

c. En el experimento de reversión con el mutante 5, se obtiene un protótrofo de particular interés. Cuando éste se cruza con una estirpe silvestre estándar, la descendencia consta de un 90 % de protótrofos y un 10 % de auxótrofos. Proporcione un explicación completa para estos resultados que incluya una razón precisa para las frecuencias observadas.

15. Está utilizando ácido nitroso para «revertir» alelos mutantes *nic-2* de *Neuropora*. Trata las células, las siembra en un medio sin nicotinamida y busca colonias protótrofas. Obtiene los resultados que se indican para dos alelos mutantes. Explique los resultados a nivel molecular e indique cómo comprobaría su hipótesis.

a. No obtiene ningún protótrofo con el alelo 1 de *nic-2*.

b. Obtiene tres colonias protótrofas con el alelo 2 de *nic-2* y las cruza por separado con una estirpe silvestre. Del cruzamiento del protótrofo A con el silvestre, obtiene una descendencia de 100 individuos, todos ellos protótrofos. Del cruzamiento del protótrofo B con el silvestre, obtiene

una descendencia de 100 individuos, de los cuales 78 son protótrofos y 22 requieren nicotinamida. Del cruzamiento del protótrofo C con el silvestre, se obtiene una descendencia de 1000 individuos, de los cuales 996 son protótrofos y 4 requieren nicotinamida.

16. Diseñe estrategias de escrutinio imaginativas que permitan la detección de los mutantes siguientes:

a. Mutantes de *Drosophila* afectados en la nervadura.

b. Mutantes de algas unicelulares haploides que carezcan de flagelos.

c. Mutantes bacterianos de gran tamaño.

d. Mutantes de un hongo haploide, normalmente blanco, que superproduzcan el pigmento negro melanina.

e. Individuos humanos (en poblaciones grandes) cuyos ojos polaricen la luz incidente.

f. Mutantes de *Drosophila* o de algas unicelulares que sean fototrópicos negativos.

g. Mutantes de levaduras haploides sensibles a la luz UV.

17. Para cada una de las lesiones de los apartados a-g, indique cuál de los siguientes sistemas permite reparar la lesión.

(1) transferasa de alquilo
(2) endonucleasa
(3) fotoliasa
(4) glucosilasa MutY
(5) glucosilasa MutM
(6) glucosilasa de uracilo de DNA
(7) reparación general por escisión de nucleótidos
(8) reparación de emparejamientos erróneos dirigida por metilación

a. Desaminación de citosina.

b. 8-oxodG.

c. Producto de adición de la aflatoxina B_1.

d. Emparejamiento erróneo debido a un error en la replicación.

e. Dímero 5'-CC-3'.

f. Sitio AP.

g. O^6-metilguanina.

17

MUTACIONES CROMOSÓMICAS I: CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA CROMOSÓMICA



[...]mostración de la presencia de una translocación recíproca [...]diante una técnica denominada *coloreado de cromosomas*. [...]suspensión de cromosomas obtenida a partir de muchas células [...] a través de un dispositivo electrónico que los separa por [...]ño. Se extrae el DNA de cromosomas individuales, se [...] uno de los posibles colorantes fluorescentes y se añade a una [...]stra de cromosomas parcialmente desnaturalizados preparados [...] un portaobjetos. El DNA fluorescente «encuentra» a [...] propio cromosoma, hibridando con él en toda su longitud y [...]ñola. En esta preparación se han utilizado un colorante azul pálido [...] rosa para teñir los diferentes cromosomas. La figura muestra [...] cromosoma rosa normal, otro azul pálido normal y otros dos [...] han intercambiado sus extremos. *(Lawrence Berkeley Laboratory.)*

Ideas fundamentales

Debido a la gran afinidad de las regiones homólogas de los cromosomas para aparear durante la meiosis, los diploides que disponen de una dotación cromosómica normal y otra que incluye alguna reorganización cromosómica generan estructuras cromosómicas emparejadas con formas y propiedades características de la reorganización.

Una deleción en una dotación cromosómica resulta generalmente deletérea, debido a que se producen desequilibrios génicos y a la manifestación de los alelos nocivos presentes en la otra dotación cromosómica.

Las duplicaciones pueden provocar desequilibrios génicos, pero proporcionan también material adicional para la divergencia evolutiva.

Las inversiones, cuando están en heterocigosis, disminuyen la fertilidad y reducen la recombinación en la región abarcada por la inversión.

La heterocigosis para una translocación reduce la fertilidad al 50 % (semiesterilidad) y provoca el ligamiento de genes situados en los cromosomas implicados en la translocación.

Se entiende por **mutación cromosómica** al proceso de cambio que da lugar a la reorganización de partes de un cromosoma, o a un número anormal de cromosomas concretos o de la dotación cromosómica completa. Como ocurre con las mutaciones génicas, el término *mutación cromosómica* se aplica tanto al proceso como al producto, de manera que las nuevas organizaciones genómicas se denominan también *mutaciones cromosómicas*. En ocasiones, las mutaciones cromosómicas se detectan mediante examen microscópico, otras veces mediante análisis genético y en otras mediante ambos procedimientos. Por el contrario, las mutaciones génicas no se detectan nunca con un microscopio: un cromosoma portador de una mutación génica tiene el mismo aspecto al microscopio que otro que contiene el alelo silvestre.

Muchas mutaciones cromosómicas provocan anomalías funcionales tanto en la célula como en el organismo. Existen dos razones básicas que explican este efecto. En primer lugar, las mutaciones cromosómicas pueden dar lugar a cambios en el número o en la posición de los genes. En segundo lugar, si la mutación se debe a una ruptura cromosómica, lo cual ocurre en la mayoría de los casos, entonces dicha ruptura puede haber ocurrido en medio de un gen, provocando así la alteración de la función.

Las mutaciones cromosómicas son importantes desde distintos puntos de vista biológicos. En primer lugar, en investigación, permiten diseñar organizaciones génicas concretas, especialmente adecuadas para dar respuesta a ciertas cuestiones biológicas. En segundo lugar, son importantes desde el punto de vista aplicado, especialmente en Medicina y en mejora animal y vegetal. Por último, las mutaciones cromosómicas han sido instrumentos eficaces para modelar los genomas, como parte del proceso evolutivo.

Consideremos algunas de las propiedades importantes de los cromosomas, útiles para la compresión de sus alteraciones estructurales.

1. En la profase I de la meiosis, las regiones homólogas de los cromosomas presentan un elevado grado de afinidad para el apareamiento y, de ser necesario, se contorsionarán para conseguir su emparejamiento. En consecuencia, se pueden observar muchas estructuras curiosas en una célula que posee una dotación cromosómica normal y otra aberrante. Recuerde que, en los cromosomas politénicos, los homólogos también se aparean (incluso sin estar en células meióticas), dando lugar a estructuras similares.

2. Los cambios estructurales se deben normalmente a rupturas cromosómicas. Los extremos cromosómicos originados son altamente «reactivos» y tienden a unirse fuertemente a otros extremos rotos. Sin embargo, los telómeros (nombre que reciben los extremos cromosómicos intactos) no tienden a unirse.

3. En un diploide, la ganancia o pérdida de partes de los cromosomas suele resultar letal. La dotación cromosómica es muy sensible a cambios en el contenido génico, incluso cuando la otra dotación está completa. Ejemplos de este tipo de perturbaciones en el balance génico aparecerán a lo largo del presente capítulo y del siguiente.

Origen de los cambios en la estructura cromosómica

Una reorganización cromosómica puede ocurrir *de novo* en una célula de cualquier tejido, dando lugar a un cariotipo heterocigótico que consta de una dotación normal y otra alterada. Las reorganizaciones que se producen en los tejidos somáticos pueden tener efectos fenotípicos en una célula o en un sector de los mismos. Cuando tienen lugar en los tejidos germinales, pueden generar meiocitos heterocigóticos. En este caso, la reorganización original pasa a una proporción de los gametos; y, además, pueden ocurrir distintos tipos de segregaciones de los cromosomas meióticos anormales, dando lugar a nuevos tipos de reorganizaciones cromosómicas que también se introducirán en los gametos. Cuando se produce una nueva reorganización entre la población de gametos, puede transmitirse asimismo a parte de la descendencia.

Los gametos con reorganizaciones se fusionarán, con mayor probabilidad, con gametos normales del sexo opuesto, por lo que el cigoto y todas las células de los individuos F_1 desarrollados a partir del mismo serán heterocigóticos para la reorganización. El efecto fenotípico potencial de ésta es, por lo tanto, mucho más severo. Además, *todos* los meiocitos de estos individuos serán heterocigóticos para la reorganización y una elevada proporción de gametos contendrá la reorganización parental u otra derivada de ésta.

La mayoría de los casos que se comentan a continuación hacen referencia a individuos cuyas células son todas heterocigóticas para una reorganización, que puede haber ocurrido *de novo* en las gónadas parentales o en los gametos, o puede haberse heredado de un parental heterocigótico.

Tipos de cambios

En el estudio de las reorganizaciones cromosómicas, conviene utilizar letras para representar las distintas regiones de los cromosomas. Estas letras hacen referencia a grandes segmentos de DNA que contienen muchos genes.

La pérdida de un segmento cromosómico se denomina **deleción** o **deficiencia**. El siguiente esquema representa la deleción de la región B:

A B C D E F → A C D E F

La presencia de dos copias de una misma región cromosómica se conoce con el nombre de **duplicación**:

A B B C D E F

Un segmento cromosómico puede rotar 180 grados y volver a unirse al cromosoma, produciendo una mutación cromosómica denominada **inversión**:

A E D C B F

Finalmente, dos cromosomas no homólogos podrían intercambiar segmentos y dar lugar a una **translocación**:

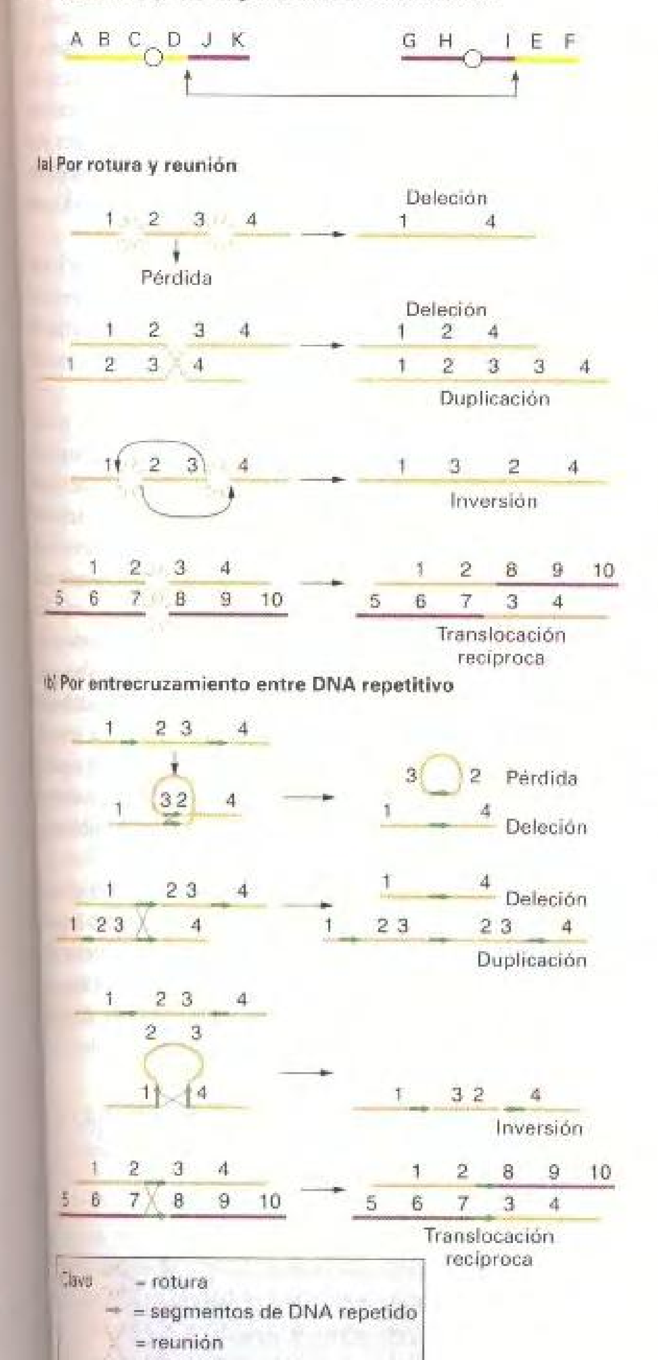


Figura 17-1. Origen de las reorganizaciones cromosómicas.

Mecanismos de cambio

Las reorganizaciones cromosómicas pueden aparecer por rotura física y posterior unión de la molécula de DNA que constituye el cromosoma. Estos procesos pueden suceder espontáneamente o ser inducidos mediante tratamiento con radiaciones de alta energía, como los rayos X o la radiación γ. Otro mecanismo puede ser el entrecruzamiento «ilegítimo» entre elementos repetidos en el genoma. Este proceso tiene lugar tras el apareamiento asimétrico entre los segmentos repetidos. Los dos mecanismos se comparan en la Figura 17-1. A continuación, trataremos las propiedades de cada una de las reorganizaciones cromosómicas.

Deleciones

El proceso espontáneo de deleción requiere dos roturas cromosómicas para la eliminación del tramo intermedio. Si ambos extremos se unen y en uno de ellos se encuentra el centrómero, se genera un cromosoma de menor tamaño portador de una deleción. El fragmento delecionado es acéntrico (carece de centrómero); en consecuencia, no puede ser arrastrado a un polo del huso acromático durante la división celular y se perderá. La radiación ionizante es un mutágeno capaz de inducir todo tipo de reorganizaciones cromosómicas. Esta clase de radiación, de la que son ejemplos los rayos X y los γ, es muy energética y provoca roturas cromosómicas. La forma en la que los fragmentos se vuelven a unir determina el tipo de reorganización que se produce. Son posibles dos tipos de deleciones. Dos roturas pueden originar una **deleción intersticial**, como muestra la Figura 17-2. En principio, una sola rotura puede generar una **deleción terminal;** aunque, debido a la necesidad de los extremos cromosómicos especiales (telómeros), aparentemente las deleciones terminales implican dos roturas, una de ellas próxima al telómero.

Los efectos de las deleciones dependen de su tamaño. Una deleción pequeña dentro de un gen, denominada **deleción intragénica**, lo inactiva y tiene el mismo efecto que otras mutaciones nulas de dicho gen. Si el fenotipo nulo homocigótico resulta viable (como, por ejemplo, en el albinismo humano), entonces la deleción también será viable en homocigosis. Las deleciones intragénicas pueden distinguirse de los cambios de un solo nucleótido porque no son reversibles.

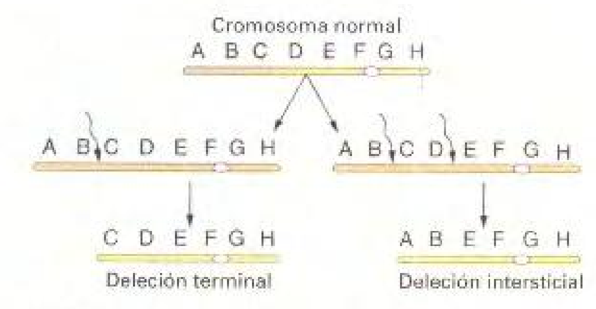


Figura 17-2. Deleciones terminales e intersticiales. Los cromosomas pueden romperse cuando son tratados con radiación ionizante (flechas ondulantes). Una deleción terminal es la pérdida del extremo cromosómico. Una deleción intersticial se origina cuando se producen dos roturas y el extremo terminal (AB) se vuelve a unir al cuerpo central del cromosoma, perdiéndose el fragmento acéntrico (CD).

En esta sección trataremos fundamentalmente las **deleciones multigénicas**, que implican la pérdida de dos a varios miles de genes, teniendo consecuencias graves. Si, mediante cruzamiento, llevamos una deleción a homocigosis (es decir, ambos cromosomas homólogos son portadores de la misma deleción), la combinación resulta casi siempre letal. Este hecho sugiere que la mayoría de las regiones cromosómicas son esenciales para la viabilidad normal y que la eliminación completa de cualquier segmento del genoma resulta deletérea. Incluso los organismos heterocigóticos para una deleción multigénica —es decir, los que poseen un cromosoma normal y otro con una deleción— pueden no sobrevivir. Existen varias razones posibles que explican este hecho. En primer lugar, los genomas se han ajustado de forma muy refinada durante la evolución y requieren un equilibrio específico de genes, de manera que la presencia de una deleción perturba este equilibrio. Retomaremos el concepto de equilibrio génico a lo largo de este capítulo y del siguiente, ya que varios tipos de mutaciones cromosómicas afectan a las proporciones relativas, o equilibrio, de los genes en el genoma. En segundo lugar, en muchos organismos existen, por todo el genoma, mutaciones letales recesivas y otras mutaciones deletéreas. Los alelos recesivos no se expresan cuando están «enmascarados» por los alelos silvestres presentes en el homólogo. Sin embargo, una deleción puede «desenmascararlos», permitiendo su expresión fenotípica.

COROLARIO

La letalidad de las deleciones en heterocigosis puede explicarse por desequilibrio genómico y por la expresión de alelos recesivos deletéreos.

No obstante, algunas deleciones pequeñas resultan viables cuando se combinan con un homólogo normal. En estos casos, la deleción se puede identificar, en ocasiones, mediante análisis citogenético. Si se examinan los cromosomas meióticos de un individuo portador de una deleción en heterocigosis, la región de la deleción puede localizarse por la ausencia de apareamiento con el segmento correspondiente del cromosoma homólogo normal, que da lugar a un **bucle de deleción** (Fig. 17-3*a*). En los insectos dípteros, los bucles de deleción se detectan en los cromosomas politénicos, en los que los cromosomas homólogos están fusionados (Fig. 17-3*b*). Una deleción puede asignarse a un sitio concreto de un cromosoma mediante la determinación de en qué cromosoma, y en qué posición a lo largo del mismo, aparece el bucle de deleción.

(a) Cromosomas meióticos



(b) Cromosomas politénicos

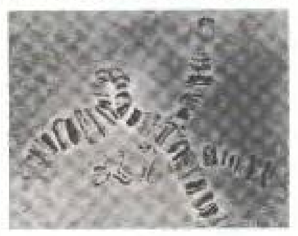


Figura 17-3. Configuración en bucle en un heterocigoto de *Drosophila* para una deleción. (a) Durante el emparejamiento meiótico, el homólogo normal forma un bucle. Los genes incluidos en este bucle no tienen alelos con los que establecer sinapsis. (b) Puesto que los cromosomas politénicos de *Drosophila* presentan patrones específicos de ordenación de bandas, puede inferirse qué bandas faltan en el cromosoma portador de la deleción, observando cuáles de ellas aparecen en el bucle del homólogo normal. (Parte b de William M. Gelbart.)

Las deleciones de algunas regiones cromosómicas dan lugar a fenotipos únicos. Un buen ejemplo es la deleción de una pequeña región cromosómica específica del genoma de *Drosophila*. Cuando uno de los homólogos es portador de la deleción, la mosca presenta un fenotipo característico que se manifiesta en forma de una muesca en el ala, por lo que, en este sentido, la deleción es dominante. Dicha deleción es letal en homocigosis y, por tanto, se comporta como recesiva respecto a la letalidad. La dominancia fenotípica que presentan ciertas deleciones puede deberse a que una de las roturas cromosómicas se haya producido en un gen que, al quedar interrumpido, se comportará como una mutación dominante.

¿Cuáles son las propiedades genéticas de las deleciones? Además del criterio citogenético, existen otros puramente genéticos que permiten inferir la presencia de una deleción. Estos criterios son particularmente útiles en especies cuyos cromosomas no son fácilmente analizables mediante técnicas citogenéticas.

Dos de los criterios genéticos ya los hemos tratado previamente. El primero es la imposibilidad de mantener el cromosoma en homocigosis por su efecto letal; sin embargo, este efecto podría ser también producido por cualquier mutación letal. En segundo lugar, los cromosomas con deleciones nunca revierten a su condición normal. Este criterio es solamente útil cuando existe un fenotipo específico asociado con la deleción.

Un tercer criterio es que, en las deleciones en heterocigosis, las frecuencias de recombinación entre los genes que flanquean la deleción son menores que en los cruzamientos control. Intuitivamente esto tiene sentido, ya que parte de la región comprende una zona cromosómica no apareada, que no puede participar en entrecruzamientos. Más adelante veremos que las inversiones tienen un efecto similar sobre las frecuencias de recombinación, pero pueden diferenciarse de otras formas.

Un cuarto criterio para inferir la presencia de una deleción es que, a veces, la deleción de un segmento en uno de los homólogos da lugar a la expresión fenotípica inesperada de alelos recesivos presentes en el cromosoma homólogo normal. Considere, por ejemplo, la deleción que se muestra en el siguiente diagrama:

$a\ b\ c$ —○— $d\ e\ f$

a^+ ······○— $d^+\ e^+\ f^+$

El fenotipo es $a^+\ b\ c\ d^+ e^+ f^+$

En este caso, no se espera la expresión fenotípica de ninguno de los seis alelos recesivos; no obstante, si b y c se expresaran, ello significaría que en el otro homólogo se habría producido la pérdida de un segmento que cubre los loci b^+ y c^+. Como en estos casos parece que los alelos recesivos se comportan como dominantes, esta situación se denomina **pseudodominancia**.

La pseudodominancia puede emplearse en sentido opuesto, utilizándose una serie definida de deleciones solapadas para lo-

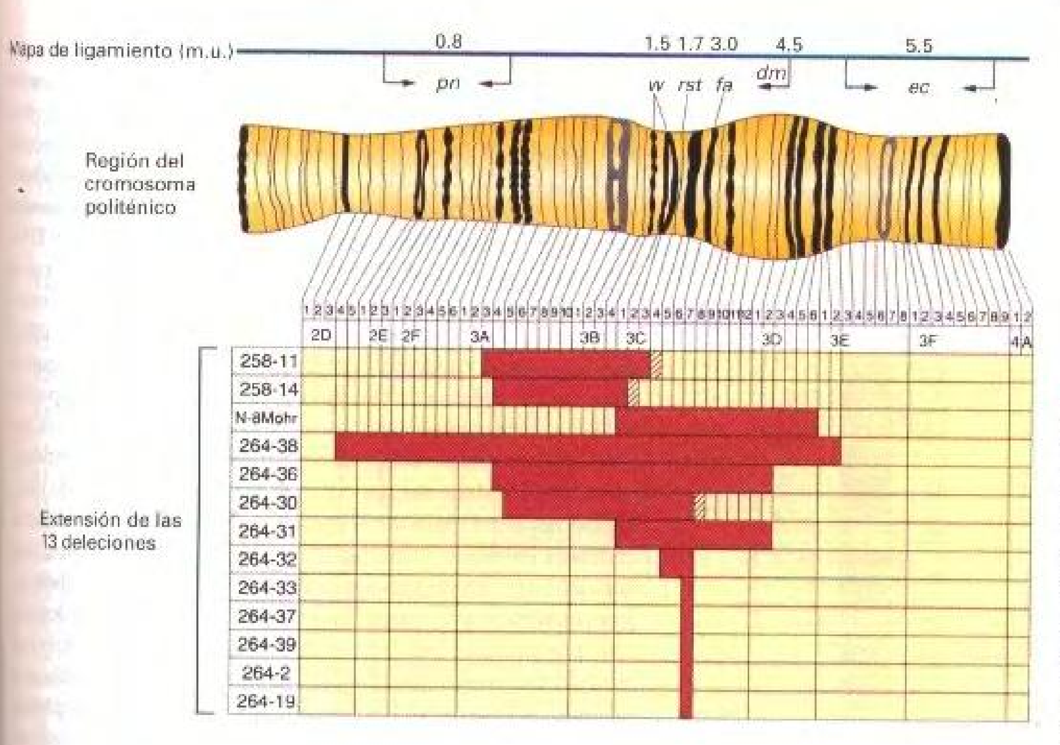


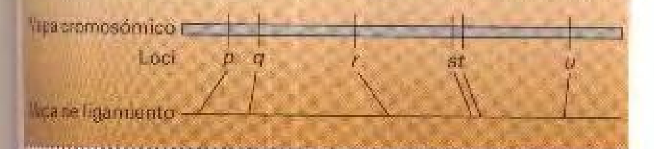
Figura 17-4. Localización de genes en regiones cromosómicas concretas, mediante el estudio de la pseudodominancia en moscas *Drosophila* heterocigóticas con cromosomas normales y delecionados. Las barras rojas indican la longitud de los segmentos que faltan en 13 deleciones distintas. Se expresarán todos los alelos recesivos cubiertos por la deleción.

calizar las posiciones de mapa de nuevos alelos mutantes. Este método recibe el nombre de **cartografía por deleción**. La Figura 17-4 muestra un ejemplo de la mosca del vinagre, *Drosophila*. En este diagrama, el mapa de ligamiento por recombinación aparece en la parte superior, marcándose las distancias, en unidades de mapa, de izquierda a derecha. En la parte inferior, las barras indican la extensión de las deleciones que se nombran a la izquierda. La mutación *prune* (*pn*), por ejemplo, muestra pseudodominancia sólo con la deleción 264-38, lo cual delimita su posición entre las regiones 2D-4 y 3A-2. Sin embargo, *fa* muestra pseudodomiancia con todas las deleciones, con la excepción de dos, de manera que su posición queda constreñida necesariamente a la banda 3C-7.

El análisis de deleción, permite crear una correlación entre el mapa de ligamiento basado en la frecuencia de recombinación y el mapa cromosómico basado en la cartografía por deleción. La gran mayoría de las veces que se ha utilizado este análisis, los dos mapas coinciden bastante bien —una aproximación citológica que corrobora satisfactoriamente los resultados obtenidos con una estrategia puramente genética.

COROLARIO

Los mapas cromosómicos realizados mediante análisis de deleción son congruentes con los mapas de ligamiento obtenidos del análisis de las frecuencias de recombinación.



Además, la pseudodominancia puede utilizarse para localizar una pequeña deleción que sea invisible al microscopio. Consideremos un cromosoma X de *Drosophila* portador de un alelo letal recesivo que se sospecha es una deleción; llamamos «X*» a este cromosoma. Podemos cruzar hembras portadoras del cromosoma X* con machos que lleven varios alelos recesivos de loci situados en este intervalo. El mapa de los genes en esta región es:

y *dor* *br* *gt* *swa* *w* *rst* *vt*
0.3 0.3 0.3 0.4 0.2 0.2 0.6

Suponga que, en cruzamientos entre hembras X*/X y machos portadores de los alelos recesivos, observamos fenotipo silvestre para los alelos *y*, *dor*, *br*, *gt*, *rst* y *vt*, pero obtenemos pseudodominancia con X* para *swa* y *w* (es decir, X*/*swa* muestra el fenotipo recesivo swa y X*/*w* el fenotipo recesivo w). Estos resultados constituyen una prueba genética a favor de la existencia de una deleción en el cromosoma que, por lo menos, incluye los loci *swa* y *w* pero no *gt* o *rst*.

COROLARIO

Las deleciones se reconocen genéticamente por (1) la reducción de la frecuencia de recombinación, (2) la pseudodominancia, (3) la letalidad recesiva y (4) la imposibilidad de reversión, y citológicamente por (5) la aparición de bucles de deleción.

Los médicos descubren deleciones en los cromosomas humanos de forma regular. Se trata, en la mayoría de los casos, de deleciones relativamente pequeñas, pero así y todo tienen consecuencias fenotípicas adversas, incluso en heterocigosis. Las deleciones de regiones concretas de los cromosomas humanos provocan síndromes con anormalidades fenotípicas únicas. Un ejemplo es el síndrome *cri du chat* o del maullido del gato, debi-

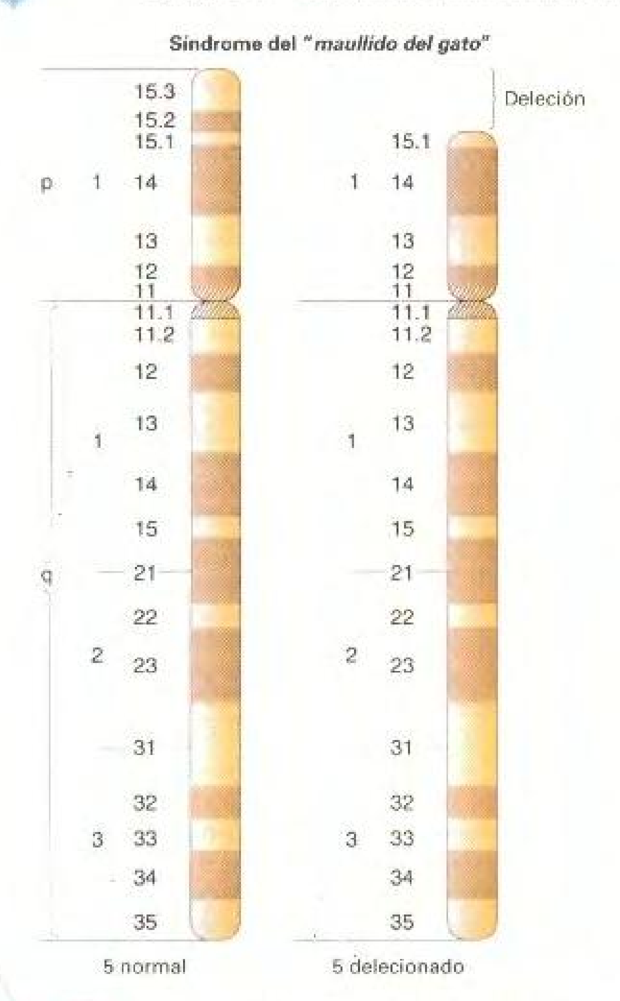


Figura 17-5. La causa del síndrome humano del «maullido del gato» es la pérdida del extremo del brazo corto de uno de los dos cromosomas 5 homólogos.

do a la heterocigosis para una deleción del extremo del brazo corto del cromosoma 5 (Fig. 17-5). Se denomina p al brazo corto de un cromosoma y q al brazo largo del mismo. Las bandas concretas delecionadas en este síndrome son 5p15.2 y 5p15.3, las dos bandas más distales que se identifican en 5p. El rasgo más peculiar del síndrome, y que le da nombre, es el sonido característico del llanto de los niños afectados por esta deleción, similar al maullido de un gato. Otras manifestaciones típicas del síndrome, son microcefalia (cabeza anormalmente pequeña), y rostro ancho, en forma de luna llena. Como los síndromes debidos a otras deleciones cromosómicas, el del maullido del gato incluye retraso mental.

La mayoría de las deleciones cromosómicas humanas, como la que acabamos de ver, aparecen de forma espontánea en la línea germinal de un parental normal de la persona afectada; de manera que no hay signos de la deleción en los cromosomas somáticos de ninguno de los parentales. Sin embargo, como veremos posteriormente, algunas deleciones humanas se originan por irregularidades meióticas en un parental heterocigótico para otro tipo de reorganización. Por ejemplo, se conocen casos del síndrome del maullido del gato derivados de un parental heterocigoto para una translocación.

Los genetistas han cartografiado genes humanos a partir de deleciones, empleando una técnica molecular denominada **hibridación *in situ***. Esta técnica se comentó en los Capítulos 3 y 6, pero ahora repasaremos sus aspectos básicos para demostrar la utilidad de las deleciones. Si se ha aislado un gen de interés u otro fragmento cromosómico utilizando tecnología molecular moderna, puede marcarse con radiactividad, o con un producto químico, y añadirse después a una preparación de cromosomas para su observación al microscopio. En esta situación, el DNA marcado reconoce y se une físicamente, por emparejamiento de bases, a su equivalente en el cromosoma; y su presencia se manifiesta como una mancha de radiactividad o tinción. Es difícil correlacionar la situación precisa de la marca con bandas específicas, pero la técnica de la deleción supone una ayuda importante. Si una deleción ocupa el locus en cuestión, no aparecerá ninguna señal cuando el ensayo se realice con el cromosoma portador de la deleción, sencillamente porque la región de hibridación no estará presente (Fig. 17-6). Mediante la recopilación de líneas celulares obtenidas de pacientes con deleciones, pueden realizarse ensayos con deleciones solapadas que cubran regiones cromosómicas específicas, permitiendo localizar con precisión la posición de un gen. En la Figura 17-7 se muestra un ejemplo con el cromosoma 11. Las barras verticales indican la longitud de las deleciones, y los fragmentos de DNA empleados como sondas se muestran a la derecha. Puede inferirse que, por ejemplo, el fragmento 270 proviene originalmente de la región que se extiende entre 11q13.5 y 11q21, porque no se une a la

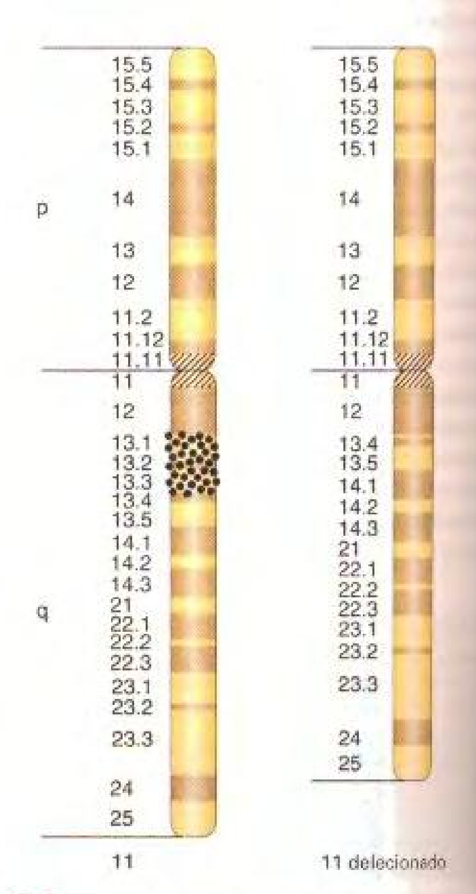


Figura 17-6. Las manchas debidas a la radiactividad sólo aparecen en uno de los cromosomas 11, porque el otro presenta una deleción en la zona a la que se une el DNA radiactivo.

Deleción

11 44 35 8 10 4B 1 7 9 23 24 A2 27A 3A 4D

Fragmento de DNA

330
237, 253, 289
10, 280
14, 35, 38, 310, 314
242
30, 229, 250, 260, 282, 312, 317, 345
202, 222
4, 8, 44, 219, 231, 247, 254, 259, 283, 288, 297, 318, 319
270
13, 37, 45, 218, 273, 325, 357
1, 204, 303
2, 6, 9, 18, 31, 43, 220, 268, 299, 304, 320
36, 46, 245, 346

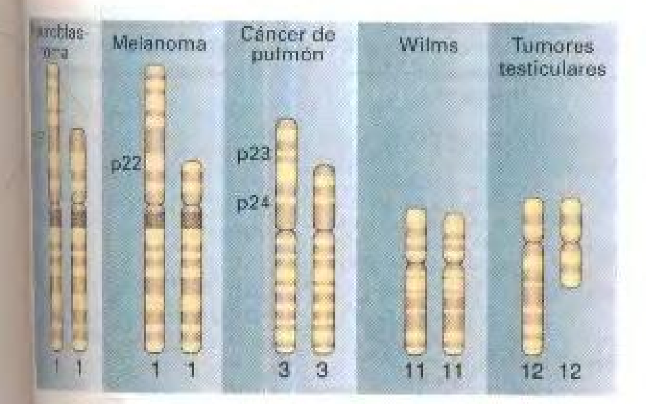
15.5 15.4 15.3 15.2 15.1 14 13 12 11.22 11.21 11.1 11 12 13.1 13.2 13.3 13.4 13.5 14.1 14.2 14.3 21 22.1 22.2 22.3 23.1 23.2 23.3 24 25

11

Figura 17-7. Asignación de fragmentos específicos de DNA humano a regiones del cromosoma 11 por su incapacidad para unirse a determinadas deleciones. Las barras rojas señalan la extensión de las deleciones, y a la derecha se muestran los fragmentos de DNA cartografiados. Observe que el fragmento 270, por ejemplo, fue incapaz de unirse a las deleciones 35, 8, 10, 7, 9, 23, 24, A2, 27A y 4D, pero se unió a las demás deleciones. La región delimitada por 11q13.5 y 11q21 falta en todas las deleciones a las que no se unió 270; puede inferirse, por tanto, que el fragmento 270 está localizado en esta región (de Y. Nakamura.)

...ciones 35, 8, 10, 7, 9, 23, 24, A2, 27A y 4D, pero sí se une a ...otras deleciones.

En células cancerosas, aparecen a menudo mutaciones cromosómicas, de las que veremos varios casos en este capítulo y en ...siguiente. Como ejemplo, la Figura 17-8 muestra algunas deleciones que aparecen repetidamente en tumores sólidos. No todas las células del tumor muestran la deleción indicada y, a menudo, se puede encontrar una mezcla de diferentes mutaciones cromosómicas en un mismo tumor. No entendemos todavía muy bien la contribución de estos cambios al fenotipo canceroso.



...ura 17-8. Deleciones que aparecen repetidamente en varios tipos ... sólidos en la especie humana. Los números de las bandas representan ... que se repiten (Jorge Yunis.)

Las deleciones revelan una diferencia interesante entre los animales y las plantas. En los animales, un macho heterocigótico para una deleción produce un número aproximadamente igual de células espermáticas funcionales con cada uno de los dos cromosomas. En otras palabras, las células espermáticas parecen funcionar, en cierto grado, independientemente de su contenido genético. En las plantas diploides, por otro lado, el polen que produce un heterocigoto para una deleción, es de dos tipos: (1) polen funcional, portador del cromosoma normal y (2) polen no funcional (o abortado), portador del cromosoma con la deleción. Por tanto, las células del polen parecen ser sensibles a los cambios en la cantidad de material cromosómico, y esta sensibilidad podría actuar como agente selectivo contra las deleciones. La situación es algo distinta en las plantas poliploides, cuyo polen tolera mejor las deleciones. Esta tolerancia se debe al hecho de que hay varias dotaciones completas de cromosomas, incluso en el polen, y la pérdida de un segmento de una de estas dotaciones es menos crucial que en una célula de polen haploide. Los óvulos tanto de plantas diploides como poliploides son también bas-

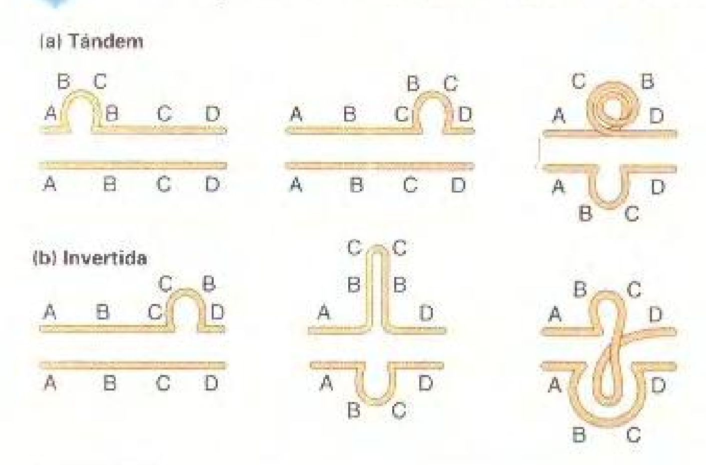


Figura 17-9. Posibles configuraciones del emparejamiento cromosómico en heterocigotos con un cromosoma normal y otro que lleva una duplicación adyacente a la región duplicada. Los segmentos duplicados pueden estar dispuestos en (a) tándem o (b) invertidos. Un segmento concreto duplicado puede adquirir distintas configuraciones en diferentes meiosis.

tante tolerantes a las deleciones, debido posiblemente al efecto alimenticio de los tejidos maternos circundantes.

Duplicaciones

Los procesos de mutación cromosómica producen a veces una copia extra de alguna región cromosómica. Considerando un organismo haploide, que tiene una única dotación cromosómica, es fácil ver por qué una duplicación tiene esta denominación: la región está ahora presente dos veces. Las regiones duplicadas pueden estar situadas una junto a otra, o bien una en su posición normal y la otra en un lugar diferente del mismo cromosoma o incluso en un cromosoma distinto. En un organismo diploide, la dotación cromosómica que contiene la duplicación aparece generalmente junto a una dotación normal. Por lo tanto, las células de este organismo heterocigótico para la duplicación tendrán tres copias de la región en cuestión, aunque se sigue hablando de duplicación porque son portadoras del producto de un solo hecho de duplicación.

En los heterocigotos para la duplicación aparecen también estructuras interesantes cuando se produce el emparejamiento de los cromosomas durante la meiosis, o en los cromosomas de las glándulas salivales. La estructura concreta que se forma depende del tipo de duplicación. Por el momento, consideraremos sólo duplicaciones adyacentes, que pueden ser en **tándem**, como en el ejemplo A B C B C D, o **invertidas**, como en A B C C B D. En la Figura 17-9 se muestran las estructuras de apareamiento que aparecen en los heterocigotos para duplicaciones adyacentes.

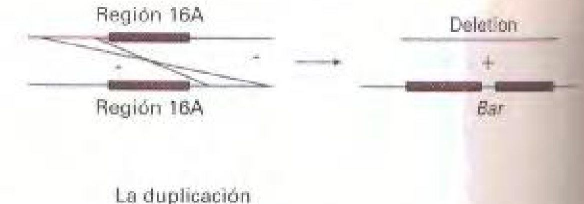
Una vez que aparece una duplicación en tándem en un individuo, es posible que tras cruzamientos endogámicos algunos descendientes sean homocigóticos para la duplicación, portadores de un total de cuatro copias de la región cromosómica afectada. Estos individuos ponen de manifiesto otro rasgo interesante de las duplicaciones, esto es, la posibilidad de apareamientos cromosómicos asimétricos, como se muestra en la Figura 17-10. Durante la meiosis, un entrecruzamiento en tales regiones emparejadas asimétricamente crea una triplicación en tándem de las mismas.

La región extra de una duplicación puede sufrir mutaciones génicas, ya que la otra copia aporta las funciones básicas necesarias de la región. La mutación de la región extra proporciona una oportunidad para la divergencia funcional de los genes duplicados, lo cual puede resultar ventajoso para la evolución genómica. De hecho, en situaciones en las que se pueden comparar productos génicos distintos que presentan funciones relacionadas, tales como las globinas (que se tratarán más adelante), se dispone de pruebas convincentes que sugieren que estos productos aparecieron mediante duplicaciones.

COROLARIO

Las duplicaciones aportan material genético adicional, capaz de evolucionar hacia nuevas funciones.

Como ocurre con algunas deleciones, las duplicaciones de ciertas regiones pueden producir fenotipos concretos y comportarse como mutaciones génicas. En *Drosophila*, por ejemplo, la mutación dominante *Bar* produce un ojo rasgado en lugar del ojo ovalado normal. Este efecto se debe a una disminución en el número de facetas de los ojos. El estudio citológico de los cromosomas politénicos ha revelado que el fenotipo Bar se debe a una duplicación en tándem de la región cromosómica 16A. La duplicación se generó probablemente por un entrecruzamiento asimétrico durante la meiosis, como se muestra a continuación:



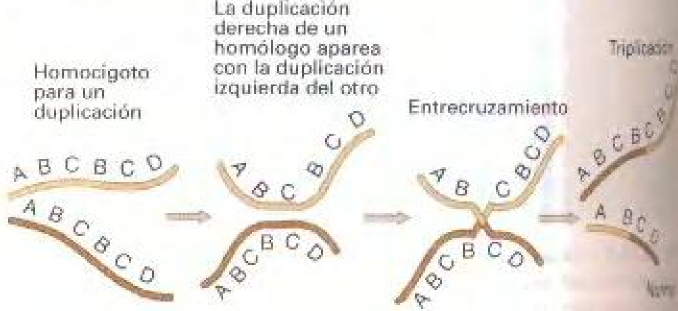


Figura 17-10. Producción de duplicaciones de órdenes superiores por apareamiento asimétrico seguido de recombinación en un homocigoto para una duplicación.

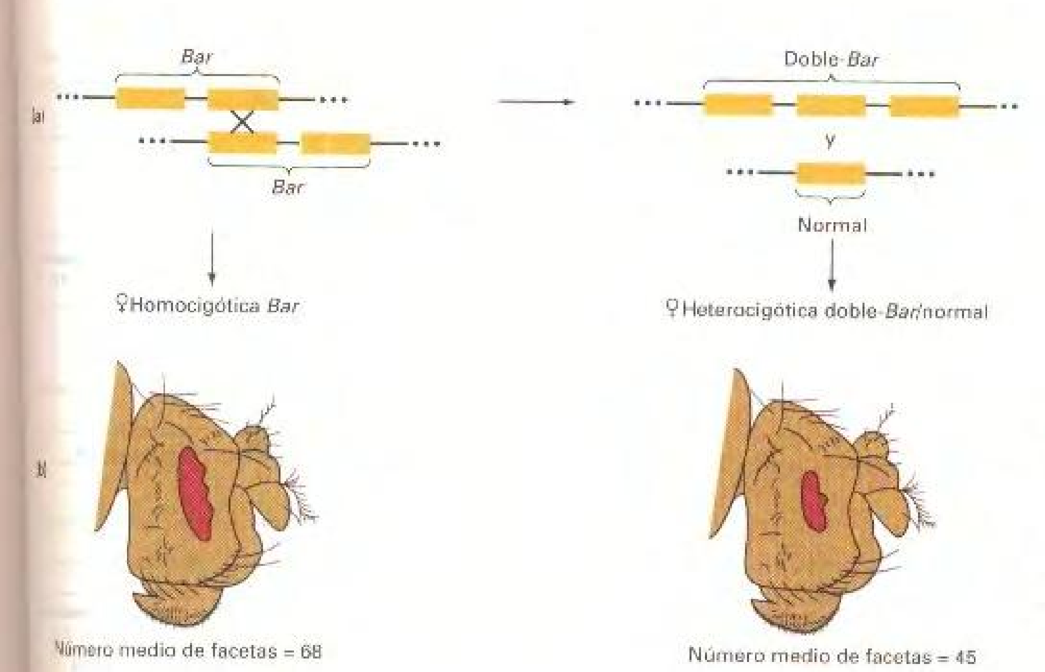


Figura 17-11. Producción de cromosomas doble-*Bar* (triplicación) y revertiente de *Bar* (normal) por apareamiento asimétrico seguido por recombinación en un homocigoto para la duplicación. (a) Representación esquemática. (b) Comparación de los fenotipos Bar y doble-Bar. (Parte b tomada de C. Bridges, *Science* 83, 1936, 210.)

Los gametos que contenían la deleción posiblemente murieron o produjeron cigotos inviables. Sin embargo, los gametos portadores de la duplicación, dieron lugar a la descendencia Bar. Los machos con la duplicación *Bar* en hemicigosis tienen ojos de tamaño muy reducido. Las hembras heterocigóticas para un cromosoma *Bar* y otro normal presentan ojos ligeramente reducidos.

Las pruebas a favor de que el emparejamiento y el entrecruzamiento asimétricos producen duplicaciones de órdenes superiores derivan del estudio de las hembras homocigóticas *Bar*. Ocasionalmente, estas hembras producen descendencia con ojos extremadamente pequeños, denominados *doble Bar*. Se ha comprobado que estos descendientes contienen tres copias en tándem de la región *Bar* (Fig. 17-11).

Algunas de las pruebas más convincentes a favor del origen de las duplicaciones en tándem (y sus deleciones recíprocas) por entrecruzamiento asimétrico derivan de los estudios de los genes que determinan la estructura de la hemoglobina humana, la molécula transportadora de oxígeno. La molécula de hemoglobina se compone de dos tipos diferentes de subunidades. Además, siempre incluye dos subunidades de cada tipo, de modo que en total contiene cuatro subunidades. A distintas edades, una persona presenta diferentes hemoglobinas, es decir, con distintos tipos de subunidades. Por ejemplo, el feto tiene dos subunidades α y dos γ ($\alpha_2\gamma_2$), mientras que el adulto tiene dos subunidades α y dos β ($\alpha_2\beta_2$). La estructura de estas subunidades está determinada por genes distintos, algunos de los cuales están ligados y otros no. La situación aparece resumida en la Figura 17-12.

El grupo de genes ligados γ-δ-β aporta los datos que necesitamos sobre el entrecruzamiento asimétrico. Algunas personas afectadas por ciertas talasemias (un tipo de trastorno hereditario de la sangre) presentan una subunidad de la hemoglobina que es parte δ y parte β (hemoglobina Lepore) o parte γ y parte β (hemoglobina Kenia). El origen de estas formas de hemoglobina poco comunes puede explicarse por los modelos de entrecruzamiento asimétrico presentados en la Figura 17-13. Los cromosomas delecionados son responsables de las hemoglobinas Lepore y Kenia, que hacen que sus portadores presenten trastornos de la sangre. En la Figura 17-13 también aparece un esquema del origen de los productos recíprocos de la recombinación, denominados *anti-Lepore* y *anti-Kenia*.

Las duplicaciones en tándem son poco frecuentes en la especie humana. La mayoría de ellas constan de un brazo o parte de

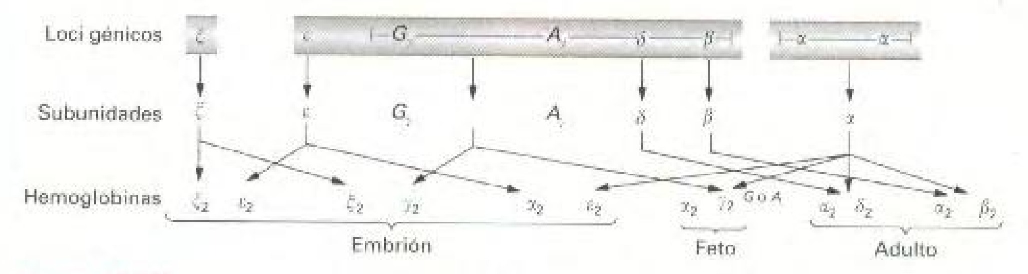


Figura 17-12. Genes humanos de la hemoglobina. Cada letra griega representa un locus génico diferente y la subunidad de hemoglobina determinada por ese gen. Estas subunidades se combinan de diferentes maneras en momentos distintos del desarrollo, como se indica en la figura, para dar lugar a moléculas funcionales de hemoglobina. (Tomado de D. J. Weatherall y J. B. Clegg, «Recent Developments in Molecular Genetics of Human Hemoglobin», *Cell* 16, 1979.)

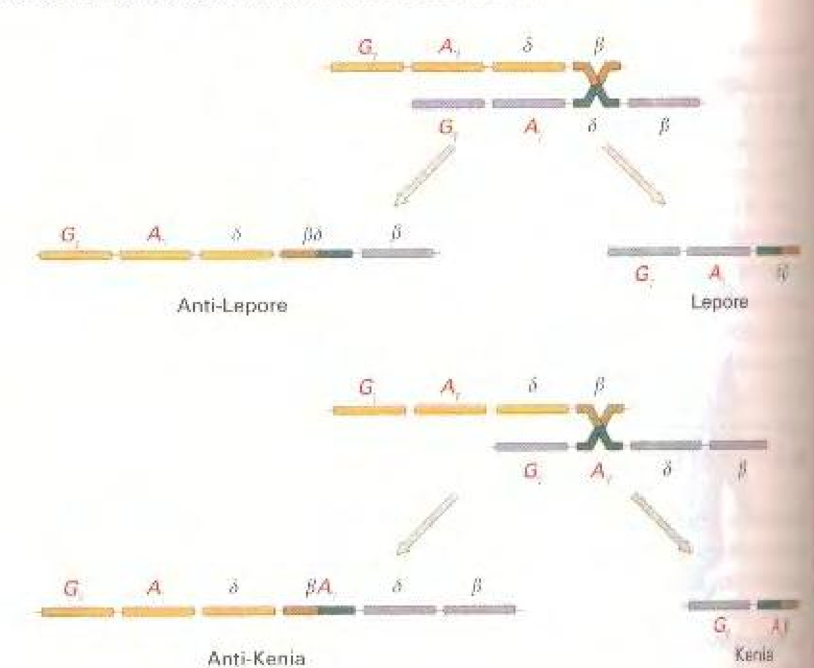


Figura 17-13. Mecanismo propuesto para la formación de variantes de las subunidades de la hemoglobina humana por recombinación asimétrica en la región genética γ-δ-β. Observe que tanto Lepore como Kenia son deleciones (Tomado de D. J. Weatherall y J. B. Clegg, «Recent Developments in Molecular Genetics of Human Hemoglobin», *Cell* 16, 1979.)

un brazo cromosómico extra, generalmente unido a un cromosoma no homólogo. En la discusión que sigue sobre otras reorganizaciones cromosómicas —inversiones y translocaciones— trataremos el origen de tales duplicaciones. Como en el caso de algunas deleciones, las duplicaciones de algunos cromosomas humanos producen síndromes de anormalidades fenotípicas. Una persona afectada de un síndrome producido por una duplicación, lleva tres copias de la región duplicada, mientras que las otras regiones cromosómicas están presentes en las dos copias normales. En Genética médica no se conocen casos de humanos homocigóticos para duplicaciones. A diferencia de las deleciones, las duplicaciones no desenmascaran alelos recesivos deletéreos, de manera que las anormalidades asociadas a las duplicaciones se atribuyen sólo al desequilibrio generado por la copia extra de la región cromosómica.

En general, las duplicaciones son difíciles de detectar y poco frecuentes. Sin embargo, son herramientas útiles y puede provocarse su aparición a partir de otras aberraciones, mediante ciertas manipulaciones que estudiaremos más adelante.

Las técnicas modernas de manipulación del DNA permiten también generar duplicaciones. Las células se pueden inducir para que absorban fragmentos específicos de DNA de su propia especie y este DNA se puede insertar en la estructura lineal de un cromosoma. Puede hacerlo en su posición normal, sustituyendo a la secuencia presente en ella, o en un sitio completamente diferente, denominado **sitio ectópico**. La inserción de DNA en un sitio ectópico genera una duplicación del fragmento adquirido. Éste es un modo directo y práctico de generar duplicaciones pequeñas.

Inversiones

Si se producen dos roturas en un cromosoma, la región entre ellas gira, a veces, 180 grados antes de que se produzca la reunión con los dos extremos. Esto crea una mutación cromosómica denominada **inversión**. A diferencia de las deleciones y las duplicaciones, las inversiones no suponen un cambio en la cantidad total de material genético, por lo que generalmente son viables y no dan lugar a anormalidad fenotípica alguna. En algunos casos, una de las roturas se produce en un gen esencial, y entonces el sitio de ruptura actúa como una mutación génica letal ligada a la inversión. En tal caso, no puede haber homocigosis para la inversión. Sin embargo, muchas inversiones sí se presentan en homocigosis. Además, también se detectan inversiones en los organismos haploides y, en estos casos, es obvio que el sitio de ruptura no puede estar situado en una región esencial. La Figura 17-14 muestra algunas de las posibles consecuencias de las inversiones en el DNA.

La mayoría de los análisis utilizan inversiones en heterocigosis —diploides en los cuales un cromosoma posee la secuencia normal y el otro lleva la inversión—. En organismos de este tipo la observación de la meiosis al microscopio muestra el lugar que ocupa el segmento invertido, puesto que un cromosoma presenta un giro en los extremos de la inversión, formando un bucle, para aparearse con el otro cromosoma que no ha girado. La pareja de homólogos forma así un **bucle de inversión** (Fig. 17-15).

La posición del centrómero en relación al segmento invertido determina el comportamiento genético del cromosoma. Si el centrómero no está incluido en la inversión, se dice que la inversión es **paracéntrica**, mientras que la inversión que incluye el centrómero se denomina **pericéntrica**:

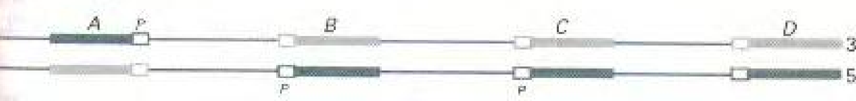
Paracéntrica A B C D E F → A B E D C F

Paricéntrica A B C D E F → A D C B E F

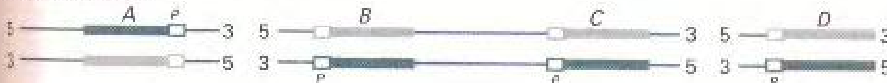
¿Qué efectos genéticos tienen las inversiones? En las inversiones paracéntricas, un entrecruzamiento en el bucle de inversión

Puntos de ruptura *entre* genes

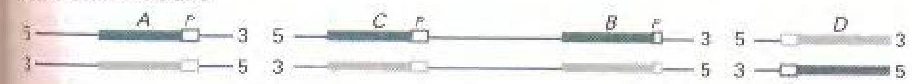
Ordenación normal



Rotura en el DNA



Alineamiento invertido

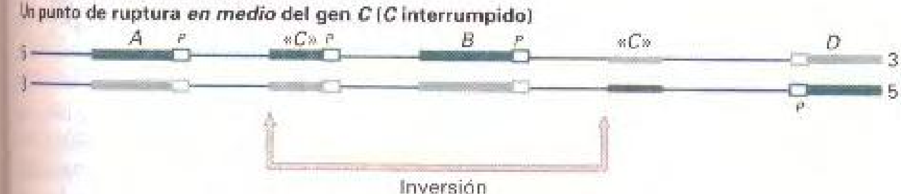


La unión de las roturas completa la inversión



Un punto de ruptura *entre* genes

Un punto de ruptura *en medio* del gen *C* (*C* interrumpido)



Puntos de ruptura *en medio* de los genes *A* y *D*

Generándose dos fusiones génicas

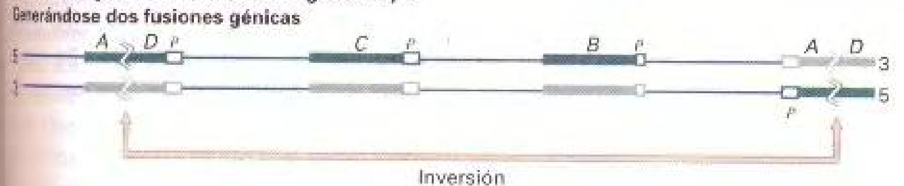
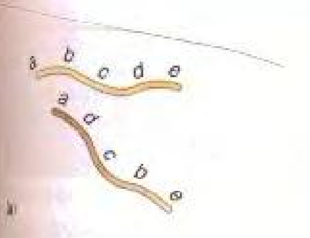
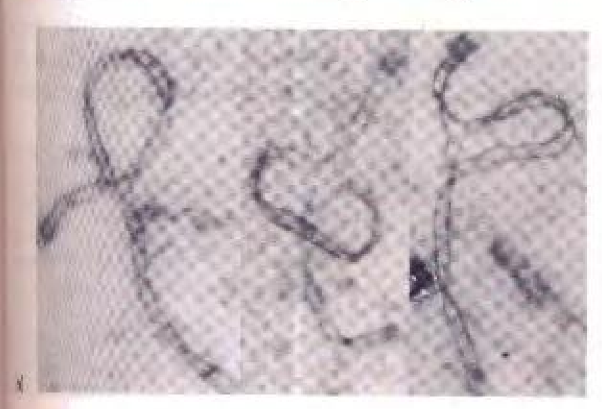


Figura 17-14. Efectos de las inversiones en el DNA. Los genes se representan con las letras *A*, *B*, *C* y *D*. La cadena molde se representa en verde oscuro; la que no actúa de molde, en verde claro; las líneas interrumpidas indican roturas en el DNA. Las letras *P* representan los promotores; las flechas gruesas indican las posiciones de los puntos de ruptura.







sión produce la conexión de los centrómeros homólogos por medio de un **puente dicéntrico** y, además, genera un **fragmento acéntrico** —un fragmento sin centrómero—. De este modo, cuando los cromosomas se separan en la anafase I, los centrómeros permanecen unidos por el puente. Esto hace que los centrómeros se orienten de tal modo que las cromátidas que no han intervenido en la recombinación sean las quedan más separadas. El fragmento acéntrico no puede alinearse ni migrar y, por consiguiente, se pierde. Finalmente, la tensión rompe el puente, dando lugar a dos cromosomas con deleciones terminales (Fig. 17-16). Los gametos portadores de estas deleciones no son viables y, aunque lo fueran, los cigotos formados serían inviables. Por lo tanto, un

Figura 17-15. Durante la meiosis, los cromosomas de un heterocigoto para una inversión se emparejan formando un bucle. (a) Representación esquemática; en realidad, cada cromosoma está constituido por un par de cromátidas hermanas. (b) Micrografía electrónica de complejos sinaptonémicos en la profase I de la meiosis de un ratón heterocigótico para una inversión paracéntrica. Se muestran tres meiocitos distintos. (Parte b de M. J. Moses, Department of Anatomy, Duke Medical Center.)

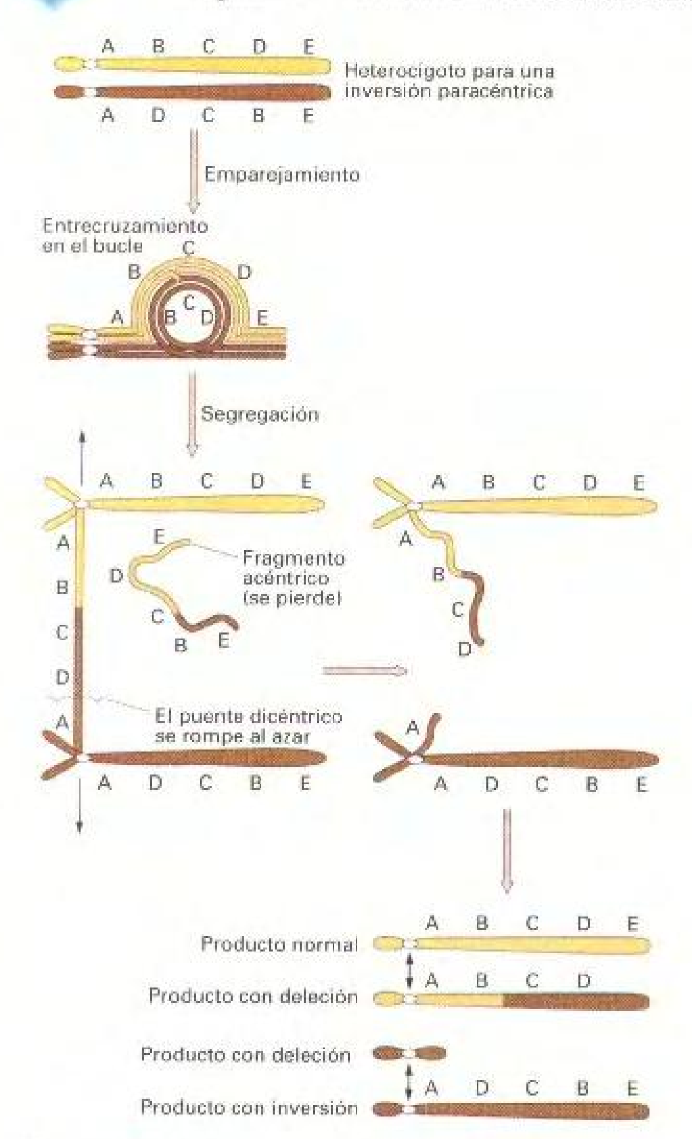


Figura 17-16. Productos meióticos resultantes de un solo entrecruzamiento dentro del bucle de una inversión paracéntrica. Se entrecruzan dos cromátidas no hermanas dentro del bucle.

hecho de entrecruzamiento, que normalmente produce la clase de productos meióticos recombinantes, genera en su lugar productos letales. El resultado total es una reducción de la frecuencia de recombinación (RF). De hecho, la RF para los genes incluidos en la inversión es cero. La RF entre genes situados a ambos lados de la inversión, se reduce en concordancia con el tamaño relativo de la misma.

Las inversiones afectan también a la recombinación de un modo distinto. Los heterocigotos para una inversión suelen tener problemas mecánicos para el apareamiento en la región de la inversión; esto reduce la frecuencia de entrecruzamientos y, por consiguiente, la frecuencia de recombinación en la región.

Aunque por causas distintas, el efecto genético neto de una inversión pericéntrica es el mismo que el de una inversión paracéntrica —no se recuperan los productos recombinante—. En una inversión pericéntrica, debido a que los centrómeros están incluidos en la región invertida, la separación de los cromosomas re-

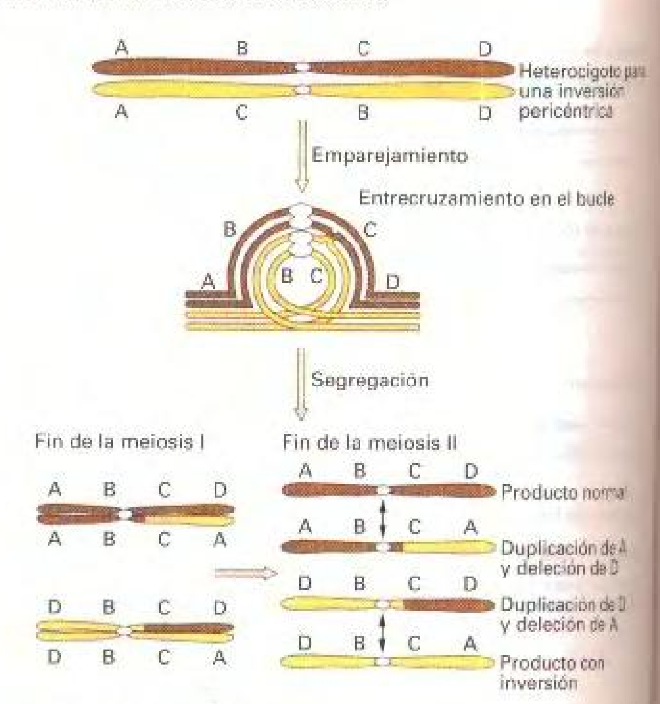


Figura 17-17. Productos meióticos resultantes de una meiosis con un solo entrecruzamiento dentro de un bucle de inversión pericéntrica.

combinantes ocurre de una forma normal, sin la creación de un puente. Sin embargo, el entrecruzamiento produce cromátidas que contienen una duplicación y una deleción de partes distintas del cromosoma (Fig. 17-17). En este caso, si ocurre la fecundación de un núcleo portador del cromosoma recombinante, el cigoto muere debido al desequilibrio génico producido. De nuevo el resultado es la recuperación selectiva de los cromosomas no recombinantes en los descendientes viables.

COROLARIO

Son dos los mecanismos que reducen el número de productos recombinantes entre la descendencia de individuos heterocigóticos para las inversiones: la eliminación de los productos de entrecruzamiento en el bucle de inversión y la inhibición del emparejamiento en la región de la inversión.

Merece la pena añadir una nota sobre las inversiones en homocigosis. En estos casos, los dos cromosomas homólogos, ambos con la inversión, aparean y recombinan normalmente, no se producen puentes y los productos meióticos son viables. Sin embar-

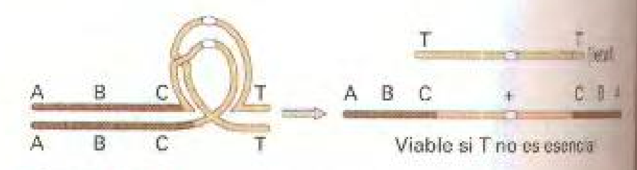


Figura 17-18. Producción de una duplicación viable, no en tándem, a partir de una inversión pericéntrica cercana a un extremo cromosómico no esencial.

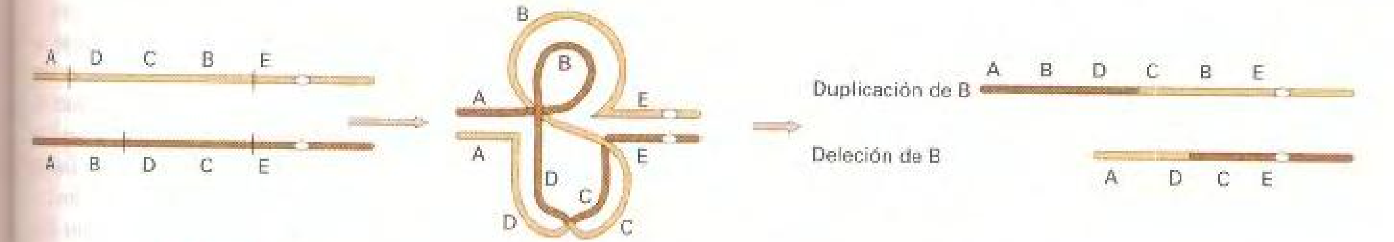


Figura 17-19. Producción de una duplicación no en tándem a partir de dos inversiones solapadas.

go, un efecto interesante que se produce consiste en que el mapa de ligamiento muestra una ordenación invertida de los genes.

Los genetistas utilizan las inversiones para generar duplicaciones de regiones cromosómicas concretas, con varios fines experimentales. Por ejemplo, considere una inversión pericéntrica en heterocigosis que tiene un punto de ruptura en el extremo (T) del cromosoma, como se muestra en la Figura 17-18. Un entrecruzamiento en el bucle produce un tipo de cromátida en la que todo el brazo izquierdo aparece duplicado; si el extremo no es esencial, se genera un conjunto de individuos portadores de la duplicación que pueden ser útiles en investigación. Otro modo de conseguir una duplicación (y una deleción) es utilizar dos inversiones paracéntricas con puntos de ruptura solapados (Fig. 17-19). Se forma un bucle complejo, produciéndose la duplicación y la deleción si hay un entrecruzamiento dentro de la inversión. Estas manipulaciones sólo son posibles en organismos cuyo mapa cromosómico esté muy elaborado y de los que se pueda disponer de una serie numerosa de reorganizaciones cromosómicas.

Hemos visto que tanto el análisis genético como la citología cromosómica de la meiosis sirven para detectar inversiones. Como ocurre en la mayoría de las reorganizaciones, también es posible detectarlas mediante análisis cromosómico durante la mitosis. Operativamente, un factor importante es buscar la aparición de nuevas relaciones de tamaño entre los brazos cromosómicos. Considere que un cromosoma ha mutado de la siguiente forma:



Observe que la relación de tamaño entre el brazo largo y el corto ha variado de aproximadamente 4 a cerca de 1, debido a una inversión pericéntrica. Las inversiones paracéntricas no alteran la relación de tamaño entre los brazos, pero se detectarían al microscopio si pudieran observarse bandas u otros marcadores cromosómicos.

COROLARIO

Los principales rasgos característicos de las inversiones en los individuos heterocigóticos son la aparición de bucles de inversión, la reducción de la frecuencia de recombinación y la esterilidad parcial, consecuencia de la aparición de productos meióticos desequilibrados o con deleciones. Algunas inversiones pueden observarse directamente al microscopio por la disposición invertida de marcadores cromosómicos.

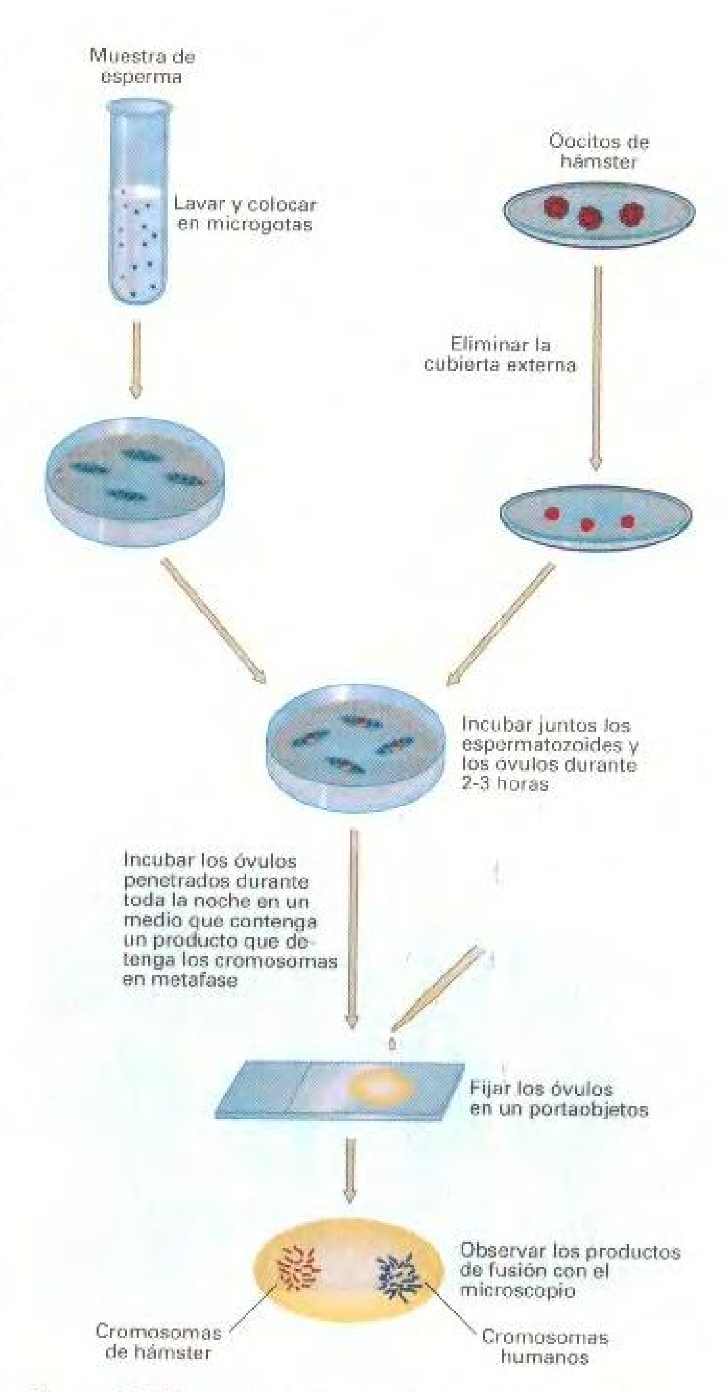


Figura 17-20. Fusión de espermatozoides humanos y oocitos de hámster para estudiar los cromosomas de los productos meióticos de los varones. (Adaptado del dibujo original de Renée Martin.)

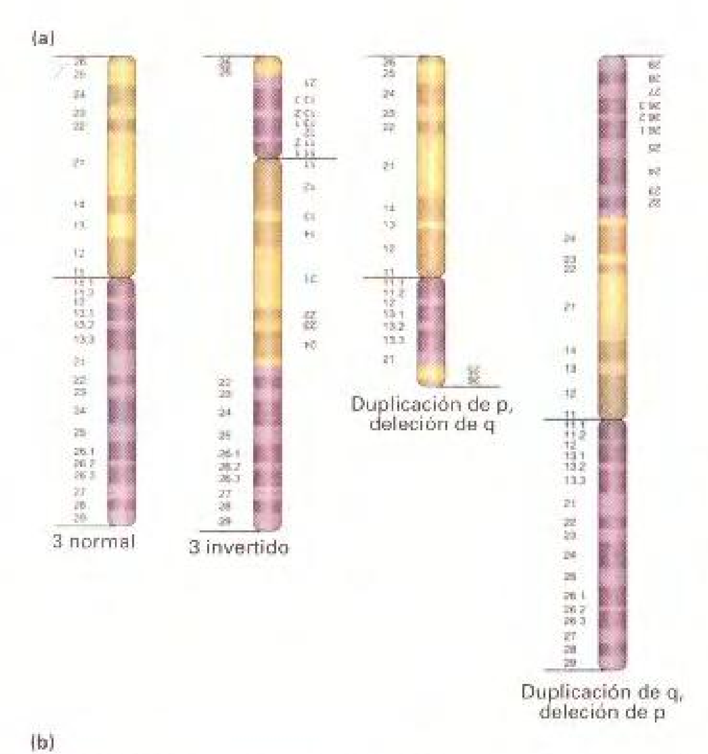
Se observan inversiones en, aproximadamente, el 2 % de los seres humanos. Normalmente, los portadores de inversiones en heterocigosis no muestran ningún fenotipo adverso, pero producen el conjunto esperado de productos meióticos anormales por entrecruzamiento en el bucle de inversión. Consideremos como ejemplo las inversiones pericéntricas. Los individuos heterocigóticos para inversiones pericéntricas producen descendientes con los cromosomas duplicados-delecionados previstos: estos descendientes muestran anormalidades de distinto grado, según la longitud de las regiones cromosómicas afectadas. Algunos fenotipos son tan anormales que los individuos no llegan a nacer y se pierden como abortos espontáneos. Sin embargo, existe un modo de estudiar los productos meióticos anormales que no depende de la supervivencia a término. Cuando se ponen en contacto esperma humano con óvulos no fertilizados de hámster dorado, los espermatozoides penetran en los óvulos, aunque no pueden fertilizarlos. El núcleo del espermatozoide no se fusiona con el del óvulo, y al realizar un examen citogenético, los cromosomas humanos se distinguen como un grupo diferente (Fig. 17-20). Esta técnica permite el estudio directo de los productos cromosómicos de una meiosis masculina, y es particularmente útil en el estudio de los productos meióticos de los varones con mutaciones cromosómicas.

En un caso concreto, un varón heterocigótico para una inversión del cromosoma 3 se sometió a un análisis de esperma. Se trataba de una gran inversión con una probabilidad elevada de entrecruzamientos en el bucle de inversión. Se detectaron cuatro tipos de cromosomas 3 en los espermatozoides del varón: normal, con la inversión y dos tipos recombinantes (Fig. 17-21). Estos cuatro tipos aparecieron en el esperma con las siguientes frecuencias:

Normal	38 %
Inversión	32 %
Duplicación de q, deleción de p	17 %
Duplicación de p, deleción de q	13 %

El cromosoma recombinante con la duplicación de q y la deleción de p se había observado previamente en varios niños anormales, pero la duplicación de p y la deleción de q no se había observado nunca, probablemente porque los cigotos que la recibían eran demasiado anormales como para desarrollarse a término. Presumiblemente, la deleción del fragmento q, que es el de mayor tamaño, tiene consecuencias más severas que la deleción del fragmento p, más pequeño.

(a)



(b)

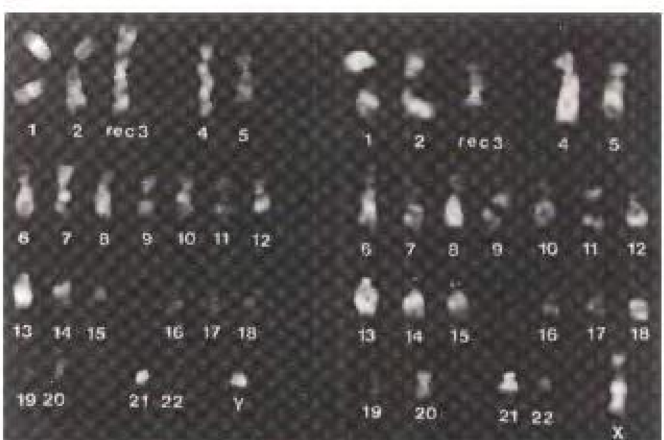


Figura 17-21. (a) Cuatro cromosomas 3 distintos, observados en el esperma de un varón heterocigótico para una gran inversión pericéntrica. Los tipos duplicación-deleción se producen como consecuencia de un entrecruzamiento en el bucle de inversión. (b) Dos dotaciones completas de cromosomas de esperma con los dos tipos de duplicación-deleción (señalados con rec 3). (Renée Martin.)

Translocaciones

Cuando dos cromosomas no homólogos sufren una mutación y intercambio de segmentos, las reorganizaciones cromosómicas resultantes se denominan translocaciones. Consideraremos aquí las **translocaciones recíprocas**, que son las más comunes. Un segmento de un cromosoma se intercambia con otro de un cromosoma no homólogo, de modo que se producen simultáneamente dos cromosomas portadores de una translocación.

El intercambio de regiones cromosómicas entre cromosomas no homólogos establece nuevas relaciones de ligamiento. Estos nuevos ligamientos se ponen de manifiesto cuando los cromosomas translocados son homocigóticos y, como veremos, incluso si son heterocigóticos. Además, las translocaciones pueden alterar drásticamente el tamaño de un cromosoma así como la posición del centrómero. Por ejemplo:



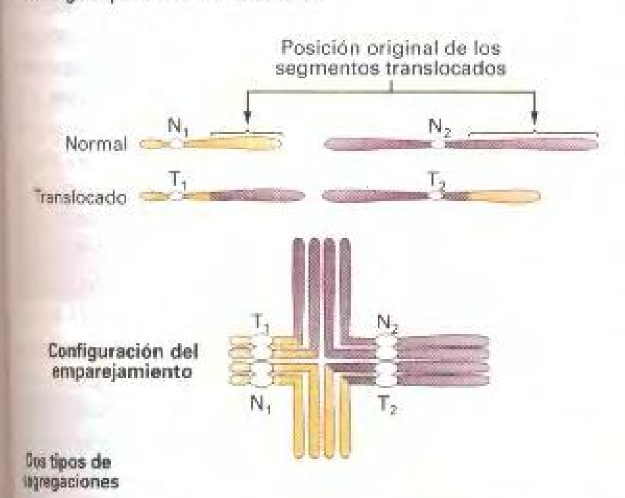
En este caso, un cromosoma metacéntrico grande se acorta hasta la mitad de su tamaño original, dando lugar a uno acrocéntrico, y el cromosoma pequeño aumenta de tamaño. En las poblaciones



Figura 17-22. Reestructuración genómica por translocación. Las flechas pequeñas indican los puntos de ruptura en uno de los homólogos de dos pares de cromosomas acrocéntricos. La fusión de los puntos de ruptura da lugar a un cromosoma metacéntrico corto y otro largo. Si, como ocurre en las plantas, tiene lugar la autofecundación, se podría producir un descendiente que tuviera un solo par de cromosomas largos y un solo par de cromosomas cortos metacéntricos. En condiciones apropiadas, se puede perder el cromosoma metacéntrico corto. Observamos que, de este modo, ocurre una conversión de dos pares de cromosomas acrocéntricos a un par de metacéntricos.

naturales, se conocen ejemplos de cambios en el número de cromosomas por translocación entre cromosomas acrocéntricos y la pérdida subsiguiente de los elementos cromosómicos más pequeños (Fig. 17-22).

Los efectos genéticos y citológicos son importantes en los heterocigotos portadores de cromosomas normales y translocados. De nuevo, la tendencia de las regiones homólogas a aparearse determina una configuración característica durante la sinapsis de los cromosomas en la meiosis. En la Figura 17-23, que representa la meiosis en un heterocigoto con una translocación recíproca, se observa una configuración cruciforme.



Dos tipos de segregaciones

Adyacente 1		Productos	
Arriba	$T_1 + N_2$	Duplicación del segmento púrpura translocado y deleción del naranja	A menudo inviables
Abajo	$T_2 + N_1$	Duplicación del segmento naranja translocado y deleción del púrpura	
Alternada			
Arriba	$T_1 + T_2$	Genotipo translocado completo	Ambos completos y viables
Abajo	$N_1 + N_2$	Normal	

Figura 17-23. Productos meióticos resultantes de los dos tipos más frecuentes de segregaciones cromosómicas en un heterocigoto para una translocación recíproca.

Recuerde que la configuración que aparece en la Figura 17-23 se encuentra en la placa ecuatorial de la célula en metafase, con las fibras del huso perpendiculares a la página. Según esto, los centrómeros migrarían hacia fuera o hacia dentro de la página. Los centrómeros homólogos apareados se separan, haya o no translocación. Puesto que la segunda Ley de Mendel también es válida para centrómeros diferentes emparejados, pueden darse dos tipos de disyunciones mayoritarias. La segregación de cada uno de los cromosomas estructuralmente normales con uno de los translocados ($T_1 + N_2$ y $T_2 + N_1$) se denomina **segregación adyacente 1**. Los dos productos meióticos presentan duplicaciones de unas regiones y deleciones de otras. Estos productos son inviables. Por otro lado, los dos cromosomas normales pueden migrar juntos, al igual que las partes recíprocas de los translocados, dando lugar a los productos $N_1 + N_2$ y $T_1 + T_2$. Este tipo se denomina **segregación alternada**, y sus productos son viables. Existe otra posibilidad, denominada **segregación adyacente 2**, en la que los centrómeros homólogos migran al mismo polo, aunque esto ocurre generalmente con una frecuencia muy baja.

Dado que las segregaciones adyacente y alternada son igualmente frecuentes, aproximadamente la mitad de los gametos será incapaz de contribuir a la siguiente generación, condición que se conoce como **semiesterilidad**. La semiesterilidad es una característica importante de los heterocigotos para una transloca-

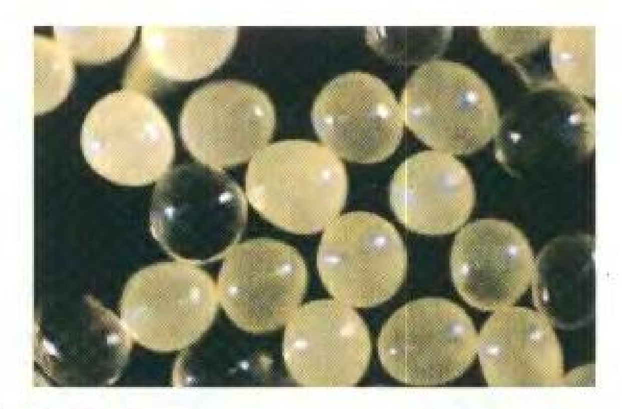


Figura 17-24. Micrografía de granos de polen normales y abortados de una planta de maíz semiestéril por la heterocigosis de una translocación recíproca. Los granos de polen claros contienen productos meióticos cromosómicamente desequilibrados. Los granos de polen opacos, que contienen el genotipo translocado completo o los cromosomas normales, son funcionales en cuanto a fertilidad y capacidad de desarrollo. (William Sheridan.)

ción. Sin embargo, la semiesterilidad se define de forma diferente en plantas y animales. En las plantas, el 50 % de los productos meióticos de una segregación adyacente tipo 1, desequilibrados, abortan normalmente en el estado de gameto (Fig. 17-24). En los animales, sin embargo, los productos meióticos con la duplicación-deleción son viables como gametos, pero letales en el cigoto.

Recuerde también que los heterocigotos para otras reorganizaciones, como las deleciones o las inversiones, pueden mostrar una cierta reducción de la fertilidad; pero la reducción exacta al 50 % de los gametos o cigotos viables constituye normalmente un diagnóstico fiable de la presencia de una translocación.

Las translocaciones son importantes desde el punto de vista económico. En agricultura, la existencia de translocaciones en determinadas estirpes cultivables produce una reducción considerable en la productividad, debido al elevado número de gametos desequilibrados que se forman. Por otro lado, las translocaciones son potencialmente útiles: se ha propuesto que los insectos responsables de plagas podrían controlarse mediante la introducción de translocaciones en las poblaciones naturales. De acuerdo con esto, el 50 % de la descendencia resultante de los cruzamientos entre insectos que llevan la translocación y los de fenotipo silvestre moriría, y 10/16 de la descendencia de cruzamientos entre insectos portadores de la translocación tampoco sería viable.

COROLARIO

Las translocaciones, las inversiones y las deleciones producen esterilidad parcial debido a que dan lugar a productos meióticos desequilibrados que pueden no ser viables o que pueden causar la muerte de los cigotos.

Un efecto genético es que los marcadores de cromosomas no homólogos pasan a comportarse como si estuvieran ligados cuando los cromosomas participan en una translocación y los loci están situados cerca de los puntos de ruptura de ésta. La Figura 17-25 representa una situación en la que se ha construido un heterocigoto para una translocación mediante un cruzamiento entre un individuo *a*/*a* ; *b*/*b* y un homocigoto para la translocación portador de los alelos silvestres. Asumiremos que *a* y *b*

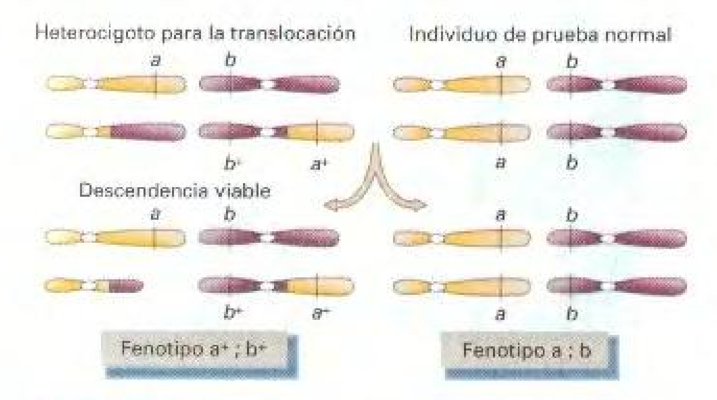


Figura 17-25. Cuando un fragmento translocado lleva un gen marcador, éste muestra ligamiento con genes del otro cromosoma implicado, ya que los genotipos recombinantes (a^+ ; *b* y *a* ; b^+, en este caso) tienden a aparecer en gametos con deficiencias y duplicaciones, y no sobreviven.

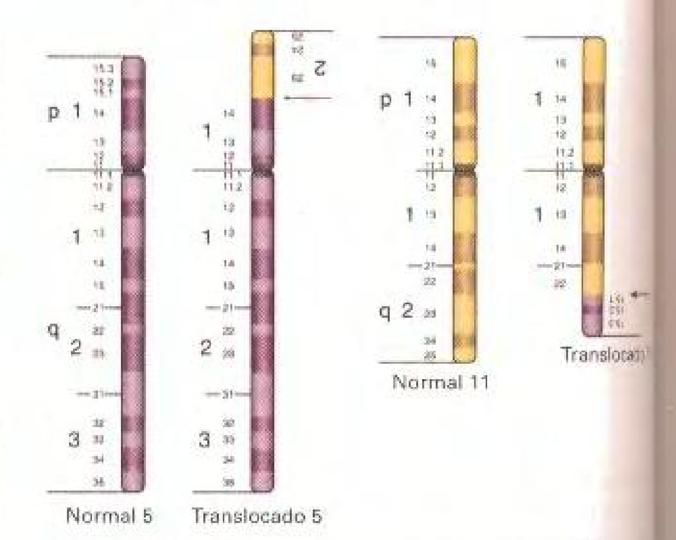


Figura 17-26. Heterocigoto humano para una translocación producida por el intercambio recíproco de 5p y 11q (5p15; 11q23).

están cerca del punto de ruptura de la translocación. Cuando se hace el cruzamiento de prueba con el heterocigoto, los únicos descendientes viables son los portadores de los genotipos parentales, de modo que se observa ligamiento entre loci que originalmente estaban en cromosomas distintos. De hecho, si se marcan los cuatro brazos de la estructura de apareamiento meiótica, el análisis de la recombinación dará lugar a un mapa de ligamiento en forma de cruz. La manifestación de ligamiento entre genes que se sabe que están situados en cromosomas diferentes es una revelación genética de la existencia de una translocación.

COROLARIO

Las translocaciones recíprocas se identifican genéticamente por semiesterilidad y por el aparente ligamiento de genes que sabemos que están situados en cromosomas distintos.

En la especie humana, las translocaciones se presentan siempre en heterocigosis. La Figura 17-26 muestra un ejemplo en el que están implicados los cromosomas 5 y 11. La descendencia de una persona con esta translocación particular presentaba una duplicación de 11q y una deleción de 5p. Estos niños mostraban el síndrome *cri du chat*, causado por la deleción de 5p, y el síndrome asociado con la duplicación de 11q. Nunca se observó el cromosoma recíproco con la duplicación-deleción.

El síndrome de Down es un conjunto de anomalías que se producen normalmente por la presencia de un cromosoma 21 extra que no se separó de su homólogo en la meiosis (véase el Cap. 18). Este tipo común de síndrome de Down (que constituye el 95 % de todos los casos) es esporádico y no presenta recurrencia dentro de la familia. Sin embargo, existe un tipo menos frecuente de síndrome de Down debido a una clase especial de translocación denominada **translocación Robertsoniana**, que sí presenta recurrencia en la familia. La translocación Robertsoniana combina los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos, como se muestra en la Figura 17-27. Inicialmente, también se

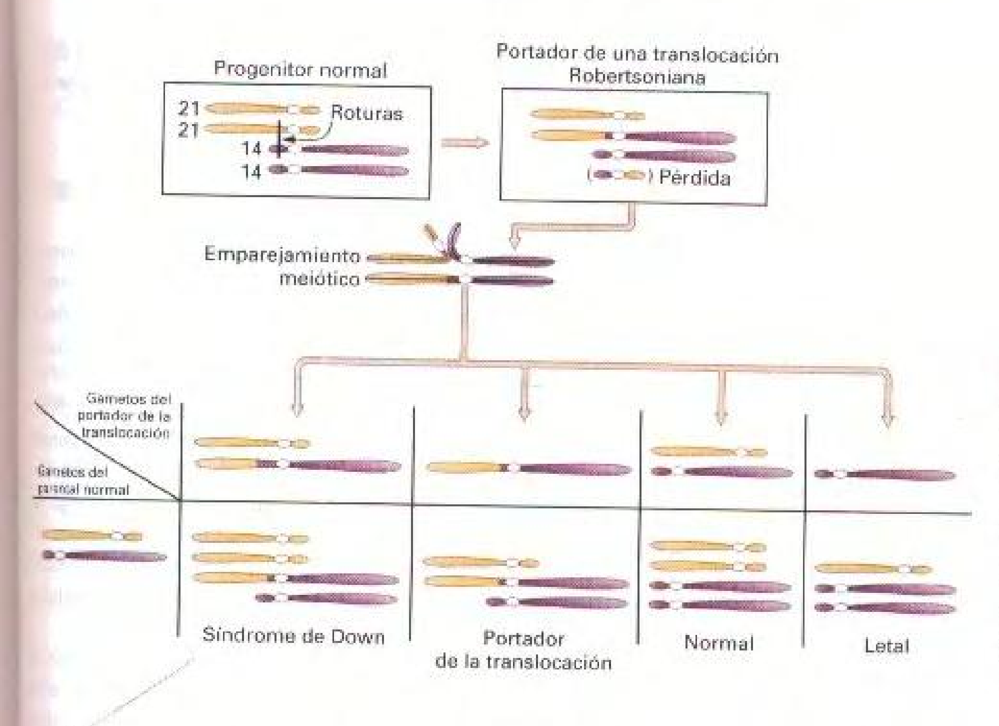


Figura 17-27. Manifestación del síndrome de Down en los hijos de un individuo no afectado portador de un tipo especial de translocación, denominada translocación Robertsoniana, en la cual se han fusionado los dos brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos. La translocación Robertsoniana concreta implicada en el síndrome de Down se produce entre el cromosoma 21 y el cromosoma 14. El síndrome de Down por translocación da cuenta de menos del 5 % de los casos.

forma un cromosoma pequeño compuesto por los dos brazos cortos; sin embargo, este cromosoma generalmente no está presente. El material genético contenido en los brazos cortos no es esencial ya que su pérdida no tiene ningún efecto fenotípico. La translocación responsable del síndrome de Down se origina por la fusión entre los cromosomas 14 y 21. El cromosoma translocado es pasado por individuos portadores no afectados a través de las generaciones. Sin embargo, la segregación meiótica en los portadores de la translocación puede dar lugar a descendientes con tres copias del cromosoma 21, como muestra la Figura 17-27, que presentan el síndrome de Down. Los factores responsables de muchas otras enfermedades hereditarias se han achacado a la heterocigosis de los padres para una translocación.

En las células cancerosas también aparecen translocaciones. La Figura 17-28 muestra algunos ejemplos en tumores sólidos. En estos tumores, las translocaciones no son tan frecuentes como las deleciones. Como ocurre con otras reorganizaciones que aparecen en las células cancerosas, la relación con el fenotipo canceroso generalmente no está clara. Sin embargo, en una sección posterior estudiaremos un ejemplo en el que el traslado de un protooncogén específico a otro locus cromosómico parece estar relacionado causalmente con el cáncer.

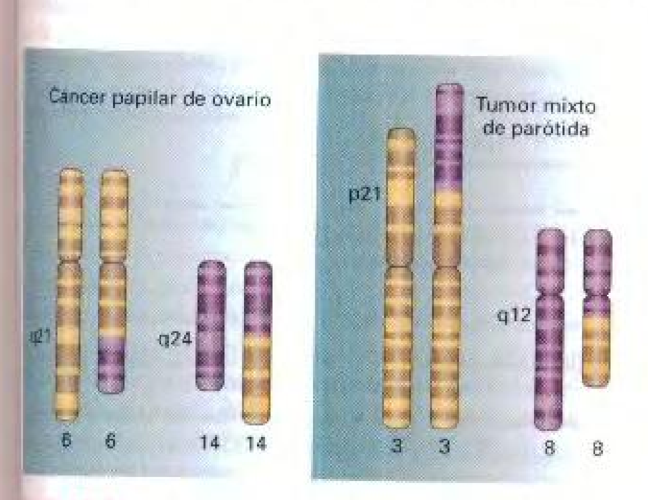


Figura 17-28. Translocaciones que aparecen repetidamente en varios ... diferentes de tumores sólidos humanos. Los números de las bandas ... los puntos de ruptura (Jorge Yunis).

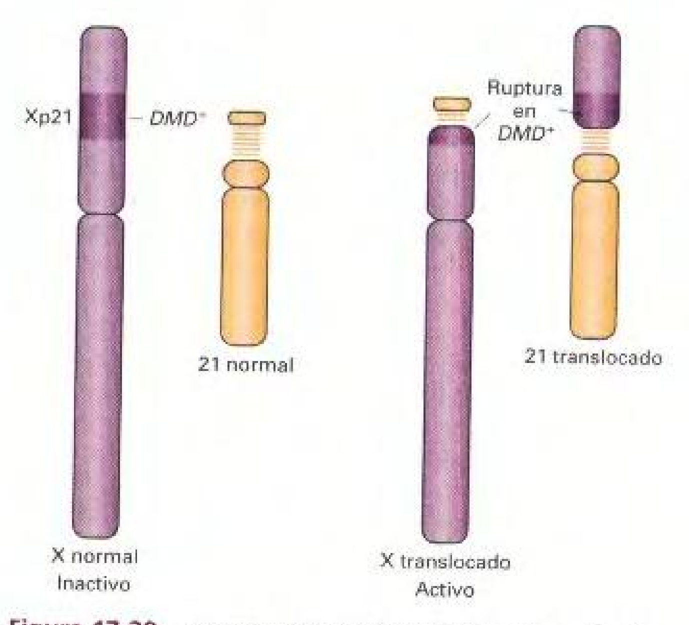


Figura 17-29. Diagrama de los cromosomas de una mujer con distrofia muscular de Duchenne y heterocigótica para una translocación recíproca entre el cromosoma X y el cromosoma 21. El punto de ruptura de la translocación interrumpe uno de los alelos DMD^+, haciéndolo no funcional, y la inactivación del cromosoma X convierte en no funcional al alelo DMD^+ no interrumpido del cromosoma X normal.

Como en otras reorganizaciones, un punto de ruptura de una translocación puede interrumpir un gen esencial, y el gen entonces se inactiva y se comporta como una mutación génica. Los genetistas moleculares utilizan este efecto para precisar la localización de genes humanos y proceder a su aislamiento. Por ejemplo, la información aportada por varias translocaciones ayudaron a la clonación del gen responsable de la distrofia muscular de Duchenne, una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X. Algunos casos poco frecuentes de esta enfermedad eran mujeres que, además, eran portadoras de translocaciones entre el cromosoma X y varios autosomas distintos. El sitio de ruptura del cromosoma X estaba siempre en la banda Xp21, lo cual indicaba que el gen causante de la distrofia muscular, que ya se sabía ligado al cromosoma X, estaba evidentemente en esa banda y había sido interrumpido por la rotura. La búsqueda del gen pudo iniciarse entonces, concentrando los esfuerzos en esa región. Observe de paso que, en una mujer, el fenotipo mutante debe ser consecuencia de que el cromosoma X normal está inactivado (Fig. 17-29).

Un punto de ruptura en un autosoma fue muy útil porque aportó una «diana» molecular para el gen de Duchenne. El sitio de ruptura concreto que adelantó la investigación estaba en el locus del RNA ribosómico (rRNA) del cromosoma 21. (No confunda la banda 21 del cromosoma X con el cromosoma 21). Existía una sonda de DNA disponible para el locus ribosómico. Se razonó que, en la translocación X-21, el gen de Duchenne debía estar interrumpido y unido a continuación del gen del rRNA. En consecuencia, los genetistas utilizaron la sonda ribosómica para clonar un segmento de DNA que contenía parte del gen de Duchenne.

Las translocaciones también se han utilizado para aislar el gen humano responsable de la neurofibromatosis. Una vez más, el material cromosómico crítico procedía de personas que no sólo sufrían la enfermedad, sino que además presentaban translocaciones. Todas ellas tenían uno de los puntos de ruptura en el cromosoma 17, en una banda cercana al centrómero. Parecía, por tanto, que ese debía ser el locus del gen de la neurofibromatosis, que habría sido interrumpido por el punto de ruptura de la translocación. Análisis subsiguientes, demostraron que los puntos de ruptura del cromosoma 17 no eran idénticos, y sus posiciones ayudaron a cartografiar la región ocupada por el gen de la neurofibromatosis. Finalmente, la obtención de fragmentos de DNA de esta región llevó al aislamiento del gen.

Utilización de las translocaciones para generar duplicaciones y deleciones

Los genetistas necesitan generar con regularidad duplicaciones o deleciones específicas para responder a preguntas experimentales. Ya hemos visto que para ello utilizan inversiones, y ahora veremos cómo utilizan también translocaciones con la misma finalidad. Tomemos *Drosophila* como ejemplo. Por motivos todavía desconocidos, las regiones muy teñidas cercanas al centrómero —regiones de *heterocromatina*—, aunque físicamente abarcan una zona extensa, contienen pocos genes. De hecho, durante mucho tiempo, la heterocromatina se consideró como un material inerte, sin utilidad alguna. En cualquier caso, basta saber aquí que *Drosophila* tolera una pérdida o exceso de heterocromatina sin que se vean afectadas notablemente su viabilidad o fertilidad.

Seleccionemos ahora dos translocaciones recíprocas distintas que afecten a los mismos dos cromosomas. Cada una de ellas tiene un punto de ruptura en alguna región de la heterocromatina y otro punto de ruptura en la *eucromatina* (no heterocromatína) en lados opuestos de la región que queremos duplicar o delecionar (Fig. 17-30). Se puede observar que, si contamos con una colección numerosa de translocaciones con un punto de ruptura heterocromatínico y muchos puntos de ruptura eucromatínicos en diferentes sitios, podemos generar a voluntad duplicaciones y deleciones en muchas partes del genoma para una variada gama de fines experimentales. Generalmente, si el sitio de ruptura de una translocación está cerca de un extremo prescindible, la duplicación o la deleción de ese extremo puede ser ignorada, y la translocación se puede utilizar para generar duplicaciones o deleciones del otro segmento translocado.

Variegación por efecto de posición

En capítulos anteriores hemos comentado varios mecanismos que generan variegación en las células somáticas de los organismos multicelulares. Estos mecanismos son la segregación, la in-

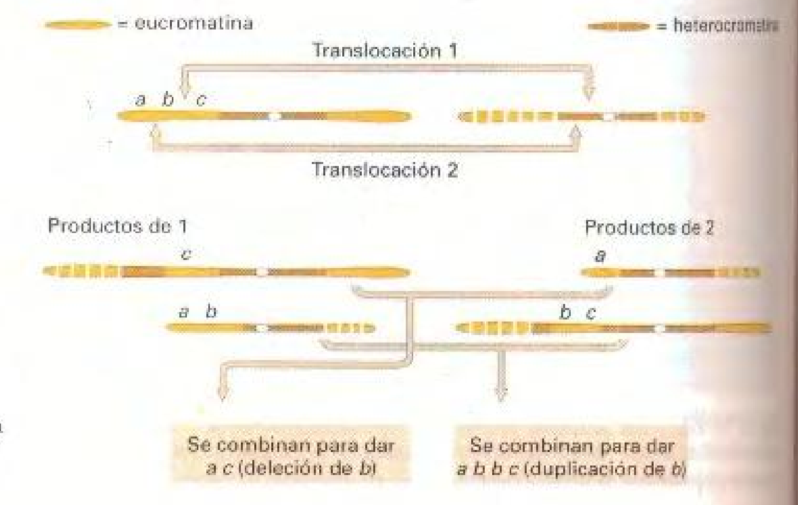
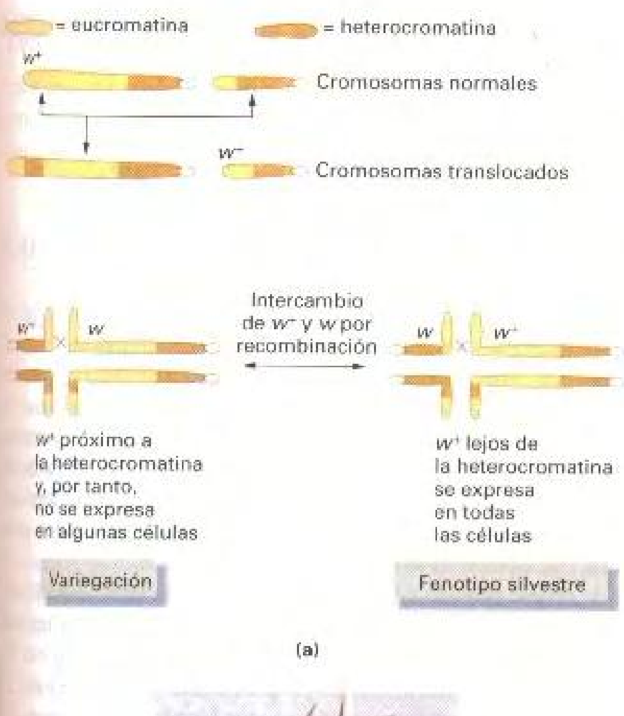


Figura 17-30. Utilización de las translocaciones con un punto de ruptura en la heterocromatina para producir una duplicación y una deleción. Si el producto superior de la translocación 1 se combina con el producto superior de la translocación 2 mediante un cruzamiento adecuado, se produce una deleción de *b*. Si se combinan los productos inferiores de las dos translocaciones, se produce el genotipo *a b b c*.





igura 17-31. Variegación de efecto posicional. (a) La translocación w^+ a una posición próxima a la heterocromatina provoca que la función w^+ no ...rese en algunas células, produciendo variegación de efecto posicional. ...specto de un ojo de *Drosophila* con variegación de efecto posicional. ...o cortesía de Randy Mottus.)

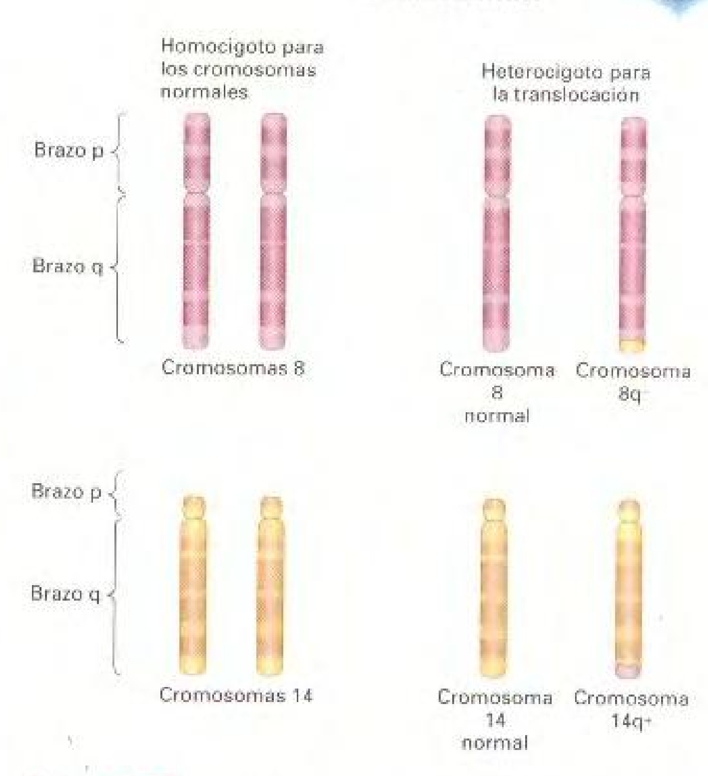


Figura 17-32. Una translocación recíproca entre los cromosomas 8 y 14 es la causa de la mayoría de los casos del linfoma de Burkitt. Un oncogén situado en el extremo del cromosoma 8 queda ahora localizado junto a la región intensificadora de un gen del cromosoma 14 que determina un anticuerpo.

...mbinación y la mutación somáticas. Otra causa de variegación ...socia a la presencia de translocaciones y se conoce como ...iegación por efecto de posición*.

...l locus que produce ojos blancos en *Drosophila* está situado ...a del extremo del cromosoma X. Considere una transloca... en la cual el extremo del cromosoma X, portador del alelo ... queda ahora situado próximo a una región heterocromatínica, ...ejemplo, del cromosoma 4. Se observa variegación por efec... posicional en las moscas heterocigóticas para dicha transloca...n con el cromosoma X normal portador del alelo recesivo w. ...fenotipo esperado es ojo rojo, porque el alelo silvestre domina ...el w. En estos casos, sin embargo, el fenotipo observado es un ojo formado por un mosaico de facetas rojas y blancas. ¿Cómo se explican estas áreas blancas? Podemos suponer que cuando el cromosoma se rompió y reunió en la translocación, de algún modo, el alelo w^+ adoptó un estado que lo hizo más susceptible a sufrir mutaciones en células somáticas; el tejido blanco del ojo reflejaría, por tanto, células en las que el alelo w^+ ha sufrido una mutación a w.

En 1972, Burke Judd probó esta hipótesis, trasladando el alelo w^+, por recombinación, desde la translocación a un cromosoma X normal, y el alelo w del cromosoma normal a la translocación (Fig. 17-31). Judd observó que, cuando llevaba el alelo w^+ desde la translocación a un cromosoma X normal, y colocaba el alelo w en la translocación, el ojo era de color rojo; esto demostraba que el alelo w^+ no era defectuoso. Cuando devolvió el alelo w^+ a la translocación, el fenotipo fue de nuevo variegado. Por lo tanto, podemos concluir que, por algún motivo, cuando el alelo w^+ se encuentra en la translocación, no se expresa en algunas células, permitiendo la manifestación del alelo w. Este tipo de variegación se denomina **variegación por efecto de posición**, ya que la expresión inestable de un gen es un reflejo de su posición en una reorganización cromosómica.

Este tipo de efecto posicional puede afectar a los genes que causan el cáncer. Por ejemplo, la mayor parte de los casos del linfoma de Burkitt, un cáncer de cierto tipo de células humanas productoras de anticuerpos, llamadas células B, se deben a la translocación de un protooncogén a una posición adyacente a una región que, normalmente, estimula la producción de anti-

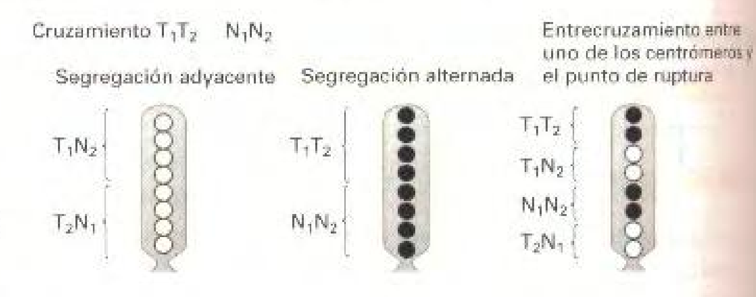


Figura 17-33. Patrones de aborto en las ascas de un cruzamiento de *Neurospora* entre una estirpe normal y otra portadora de una translocación recíproca. Las esporas sexuales blancas abortan; las negras son viables. T_1 y T_2 representan los cromosomas translocados; N_1 y N_2 representan los cromosomas normales. El asca con cuatro esporas negras y cuatro blancas se produce por un entrecruzamiento entre cualquiera de los centrómeros y el punto de ruptura de la translocación.

cuerpos (Fig. 17-32). Como resultado, el oncogén se activa y produce el cáncer.

COROLARIO

La expresión de un gen puede verse afectada por su posición en el genoma.

Diagnóstico de las reorganizaciones mediante el análisis de tétradas

En los hongos, el análisis de tétradas es muy útil para detectar aberraciones cromosómicas. En *Neurospora*, cualquier genoma que contenga una deleción produce una ascospora que no madura al color negro normal y es incapaz de germinar. Los parentales de los cruzamientos que dan lugar a proporciones elevadas de ascosporas blancas «abortadas» son generalmente portadores de reorganizaciones cromosómicas. Las duplicaciones suelen producir ascosporas viables negras.

A veces, pueden identificarse reorganizaciones específicas mediante la detección de patrones concretos de esporas no viables. Por ejemplo, una translocación hace que aparezcan tres tipos de ascas en determinadas proporciones. La mayoría de las ascas contienen ocho ascosporas negras (producidas por meiosis de segregación alternada) u ocho ascosporas blancas (producidas por meiosis de segregación adyacente 1). Unas pocas ascas tienen cuatro esporas negras y cuatro blancas, consecuencia de un hecho de recombinación entre cualquiera de los centrómeros y el punto de ruptura de la translocación (Fig. 17-33).

RESUMEN

Las dotaciones cromosómicas sufren mutaciones espontáneas raras, que generan reorganizaciones o cambios en el número de cromosomas, llamadas en general mutaciones cromosómicas.

Cuatro de las reorganizaciones estructurales de los cromosomas son las deleciones, las duplicaciones, las inversiones y las translocaciones. Las deleciones son pérdidas de partes de los cromosomas. Si la región eliminada es esencial para la vida, las deleciones son letales en homocigosis. En heterocigosis, pueden ser o no letales y también desenmascarar alelos recesivos, provocando entonces su expresión fenotípica. Los individuos heterocigóticos para las deleciones muestran una disminución de la recombinación entre los loci adyacentes a éstas. Las deleciones en un homólogo, a menudo, permiten la expresión de los alelos recesivos presentes en el otro.

Las duplicaciones en tándem, se producen en ocasiones por un entrecruzamiento desigual, y las que no se encuentran en tándem aparecen a partir de otros tipos de reorganizaciones. Las duplicaciones pueden producir desequilibrios en el balance del material genético, provocando, por tanto, la aparición de un efecto fenotípico deletéreo en el organismo, o incluso la muerte. Sin embargo, en numerosas especies, incluida la humana, pueden conducir a un aumento en la variedad de funciones génicas. En otras palabras, las duplicaciones pueden ser fuente de nuevo material genético para la evolución.

Una inversión es un giro de 180 grados de parte de un cromosoma. En homocigosis, las inversiones pueden causar escasos problemas en el organismo, a menos que den lugar a un efecto de posición en la heterocromatina, o que uno de los puntos de ruptura se encuentre en medio de un gen. Por otro lado, los individuos heterocigóticos para las inversiones presentan dificultades de emparejamiento en la meiosis, formándose un bucle de inversión. Un entrecruzamiento dentro del bucle da lugar a productos meióticos inviables. Los productos meióticos recombinados de inversiones pericéntricas, las que incluyen al centrómero, difieren de los de las inversiones paracéntricas, que no incluyen al centrómero, pero en ambos casos se reduce la frecuencia de recombinación en la región afectada y se produce una disminución de la fertilidad.

Una translocación mueve un segmento de un cromosoma a otra posición del genoma. En heterocigosis, generan productos meióticos con duplicaciones y deleciones, que mueren o provocan letalidad cigótica. Como consecuencia de las translocaciones, se pueden dar nuevas relaciones de ligamiento. Los individuos heterocigóticos para una translocación muestran un 50 % de esterilidad (semiesterilidad).

Las reorganizaciones cromosómicas son una causa importante de enfermedades en las poblaciones humanas y son útiles para la construcción de estirpes concretas de algunos organismos, tanto en biología básica como aplicada. Durante la evolución, se han producido grandes reorganizaciones cromosómicas.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

genoma / deleción / bucles / duplicación / apareamiento / frecuencia de recombinación / heterocigotos / inversiones / letalidad / proporciones fenotípicas

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

Se ha realizado una búsqueda de mutantes de *Drosophila* para detectar mutaciones letales recesivas en el cromosoma 2, obteniéndose 10 mutaciones de este tipo. Se cruzaron entre sí moscas portadoras de estas mutaciones para producir cigotos híbridos, cada uno de los cuales era portador de un cromosoma letal de una línea mutante y un cromosoma letal de otra línea. Se realizaron cruzamientos en todas las combinaciones posibles y, en cada caso, se analizó la viabilidad de los cigotos híbridos. Los resultados se muestran en la tabla, donde el signo «+» significa que el híbrido era viable y el signo «−» que la combinación de dos mutaciones recesivas, aisladas independientemente, era letal.

Interprete los resultados con tanta precisión como le sea posible, indicando:

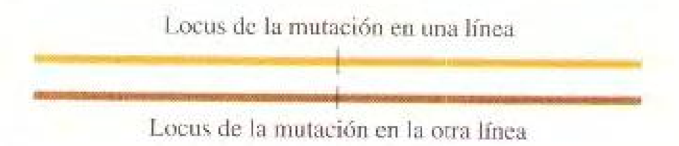
- ¿Cómo pueden producirse genéticamente los cigotos viables e inviables?
- ¿Cuántos genes están implicados?
- ¿Qué puede decirse acerca de su posición?
- Discuta el significado de cualquier desviación de los datos respecto a un patrón definido.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+
2		−	+	+	+	+	+	+	+	−
3			−	+	+	+	−	+	+	+
4				−	+	−	+	+	+	−
5					−	+	+	+	−	−
6						−	+	+	+	−
7							−	+	+	+
8								−	+	+
9									−	−
10										−

Solución

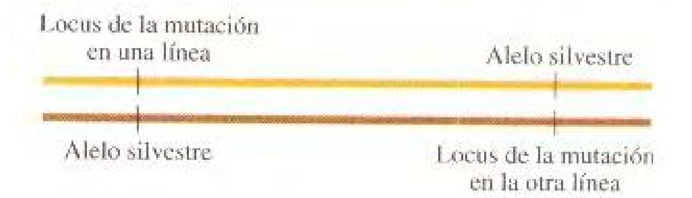
Para empezar, volvamos a plantear de nuevo el problema; en cada cruzamiento, el genetista reúne en un par de cromosomas homólogos dos mutaciones letales recesivas que han sido aisladas independientemente. Podemos pensar en varias situaciones posibles.

En primer lugar, podría tratarse de mutaciones puntuales situadas en el mismo gen:



En este caso, podemos predecir que el genotipo del híbrido será letal ya que, como estudiamos en el Capítulo 4, esto es lo que pasa con las mutaciones letales recesivas. Por tanto, quizás algunos de los cigotos inviables de la tabla pueden explicarse por la combinación de mutaciones puntuales en el mismo gen.

Otra posibilidad es que las dos mutaciones hayan ocurrido en genes diferentes del cromosoma 2:



Puesto que las mutaciones son recesivas, lo cual implica que los alelos silvestres son dominantes, puede predecirse que este tipo sería viable. De hecho, en el Capítulo 4 llamamos *complementación genética* a este tipo de efecto, basado en la idea de que los dos alelos silvestres están «ayudándose el uno al otro». Esto podría explicar los cigotos viables que aparecen en la tabla.

Basándonos en este razonamiento, el siguiente paso que podemos dar es encontrar qué mutaciones afectan a un mismo gen, lo cual nos dirá algo también acerca de cuántos genes están implicados.

Empezando con la mutación 1, y mirando a lo largo de la fila, vemos que no complementa con las mutaciones 3 y 7, así que podemos inferir, provisionalmente, que las mutaciones 1, 3 y 7 están en el mismo gen. Haciendo lo mismo con las otras mutaciones, obtenemos los siguientes grupos (escritos en columnas):

1	2	4	5	8
3	10	6	9	
7		10	10	

Aparece un patrón que sugiere que había cinco genes mutados en las diferentes líneas. Pero hay una incongruencia sorprendente en el patrón de complementación, y es el comportamiento de la mutación 10. Ésta no complementa con las mutaciones de tres grupos diferentes. ¿Qué tipo de mutación puede comportarse así? Si consideramos nuestra hipótesis de que hay cinco genes implicados, la mutación 10 debe haber dañado a tres genes distintos. Obviamente, una posibilidad es que se trate de una deleción. Además, hemos estudiado en este capítulo que, normalmente, las deleciones se comportan como mutaciones letales recesivas, y ello es coherente con la aparición de la mutación 10 en una búsqueda de letales recesivos.

Por tanto, podemos esquematizar lo que hemos aprendido sobre el cromosoma 2 de la siguiente forma:

	GENES				
	A	*B*	*C*	*D*	*E*
	1	2	4	5	8
	3		6	9	
Deleción	7				

Pero observe que ésta es sólo una de las muchas organizaciones posibles; no tenemos ningún dato acerca del orden de *B*, *C* y *D* en la región delecionada y, además, no sabemos si *A* y *E* están en el mismo lado o en lados opuestos de la deleción.

Vea los conceptos utilizados en esta solución: dominancia y recesividad, del Capítulo 2; complementación, del Capítulo 4; mutación génica, del Capítulo 15, y deleción, del presente capítulo.

PROBLEMAS RESUELTOS

1. Se obtiene una planta de maíz que es heterocigótica para una translocación recíproca y, por tanto, semiestéril. Se retrocruza esta planta con una planta cromosómicamente normal y homocigótica para el alelo recesivo braquítico (*b*), situado en el cromosoma 2. Una planta semiestéril de la F_1 se retrocruza con la estirpe homocigótica para el alelo *b*. La descendencia tiene los fenotipos siguientes:

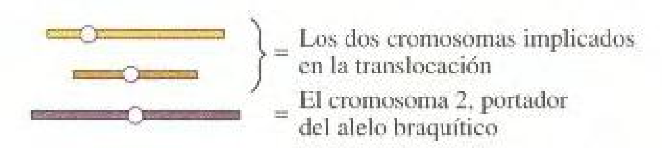
NO BRAQUÍTICO		BRAQUÍTICO	
Semiestéril	Fértil	Semiestéril	Fértil
334	27	42	279

a. ¿Qué proporción esperaría si el cromosoma portador del locus braquítico no estuviera incluido en la translocación?

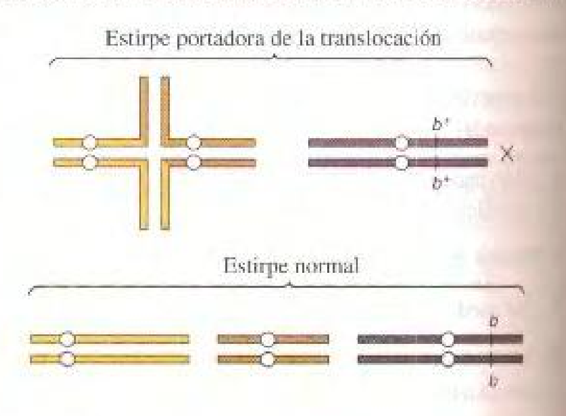
b. ¿Cree que el cromosoma 2 está implicado en la translocación? Explique su respuesta, mostrando la conformación de los cromosomas relevantes de la planta semiestéril F_1 e indicando por qué se obtienen los números indicados.

♦ Solución ♦

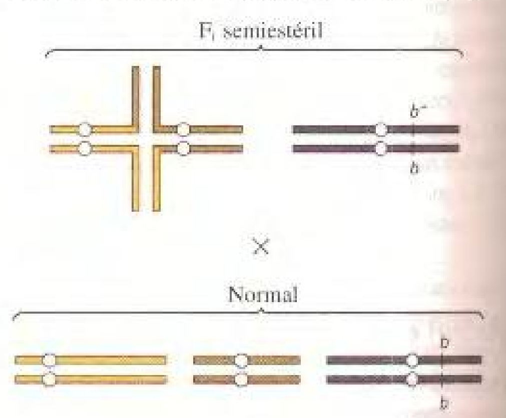
a. Deberíamos empezar con una aproximación metódica y hacer una mera reestructuración de los datos en forma de diagrama, donde



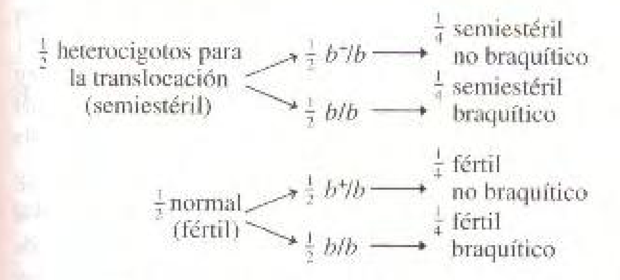
Para simplificar el diagrama, no presentaremos los cromosomas divididos en cromátidas (aunque, en realidad, se encontrarían así en esta etapa de la meiosis):



Toda la descendencia de este cruzamiento será heterocigótica para el cromosoma 2, pero ¿qué ocurrirá con los cromosomas implicados en la translocación? En este capítulo, hemos visto que sólo sobreviven los productos de una segregación alternada, y que la mitad de estos supervivientes será cromosómicamente normal y la otra mitad será portadora de los cromosomas reorganizados. Este último tipo producirá heterocigotos para la translocación cuando se combine con el complemento cromosómico normal del parental normal. Estos, los semiestériles de la F_1, se esquematizan a continuación como parte del retrocruzamiento con la estirpe parental braquítica:

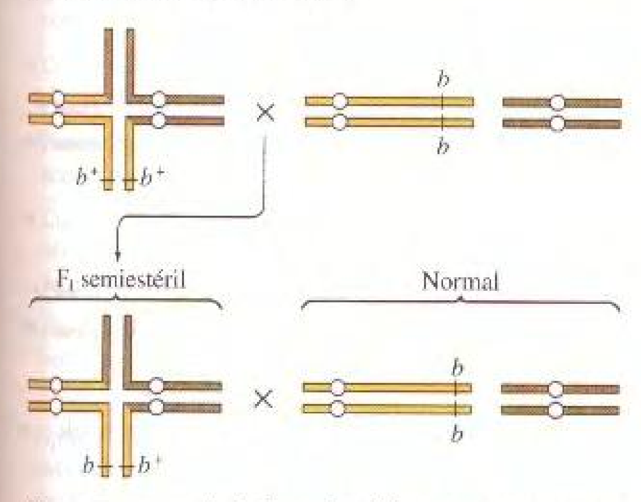


Para predecir las proporciones fenotípicas entre la progenie de este cruzamiento, podemos tratar el comportamiento de los cromosomas translocados independientemente del par portador del alelo braquítico. Entonces, podemos esperar que la descendencia sea:



Esta proporción esperada 1:1:1:1 es bastante distinta de la observada.

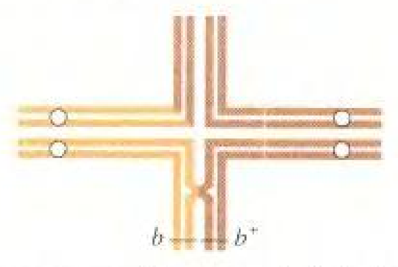
b. Ya que, con el supuesto de la existencia de independencia, hemos observado una desviación respecto de la proporción esperada, parece probable que el cromosoma 2 esté implicado en la translocación. Supongamos que el locus braquítico (*b*) se encuentra en el cromosoma representado con el color amarillo. Pero ¿dónde? A efectos del diagrama no importa en qué sitio lo coloquemos, pero genéticamente sí tiene importancia, porque la posición de *b* afecta a las proporciones fenotípicas observadas entre la descendencia. Si suponemos que *b* está localizado cerca del extremo del fragmento translocado, podemos volver a escribir el proceso como muestra la siguiente figura:



Si los cromosomas de la F_1 semiestéril segregan como en el diagrama, podemos predecir

$\frac{1}{2}$ fértil braquítico
$\frac{1}{2}$ semiestéril no braquítico

La mayoría de la descendencia pertenece a este tipo, por lo que, aparentemente, vamos por buen camino. ¿Cómo se producen los dos tipos minoritarios? De algún modo, tenemos que conseguir trasladar el alelo b^+ al cromosoma normal representado en color amarillo y el alelo *b* al cromosoma translocado. Esto se podría conseguir por recombinación entre el punto de ruptura de la translocación (el centro de la estructura en forma de cruz) y el locus braquítico. Para representar este entrecruzamiento, debemos dibujar los cromosomas con las cromátidas, ya que la recombinación ocurre en la etapa de dos cromátidas:



Los cromosomas recombinantes producirán descendencia fértil no braquítica y semiestéril braquítica (69 de este tipo de un total de 682, lo que equivale a una frecuencia aproximada del 10 %). Podemos ver que esta frecuencia es realmente una medida de la distancia de mapa (10 u.m.) del locus braquítico al punto de ruptura. (Se habría obtenido el mismo resultado si hubiéramos dibujado el locus braquítico en la parte del cromosoma al otro lado del punto de ruptura.)

2. Una genetista dedicada al estudio del maíz está investigando la recombinación entre dos genes, *b* y *l*, que están separados 18 u.m. en el brazo derecho del cromosoma 12. Está particularmente interesada en una línea pura (M) aislada de la naturaleza. Cuando la línea M se cruza consigo misma, se observa la frecuencia de recombinación esperada del 18% entre *b* y *l*, que es exactamente la misma frecuencia que se obtiene cuando se trabaja con la línea convencional (P). Sin embargo, cuando se cruza una estirpe derivada de M, marcada apropiadamente, con otra estirpe derivada de P también marcada adecuadamente ($b^+ l^+/b^+ l^+ \times b\ l/b\ l$) y las plantas de la F_1 se someten a cruzamiento de prueba con una estirpe $b\ l/b\ l$ de M, el valor de la frecuencia de recombinación se reduce al 2 %. Se obtiene el mismo valor cuando se realiza el cruzamiento de prueba entre la F_1 y una estirpe $b\ l/b\ l$ de P. Formule un modelo que explique:

a. El valor de RF dentro de la línea M.

b. El valor de RF dentro de la línea P.

c. El valor de RF en el cruzamiento de prueba $F_1 \times M$.

d. El valor de RF en el cruzamiento de prueba $F_1 \times P$.

e. El *origen* de los recombinantes en los cruzamientos de prueba.

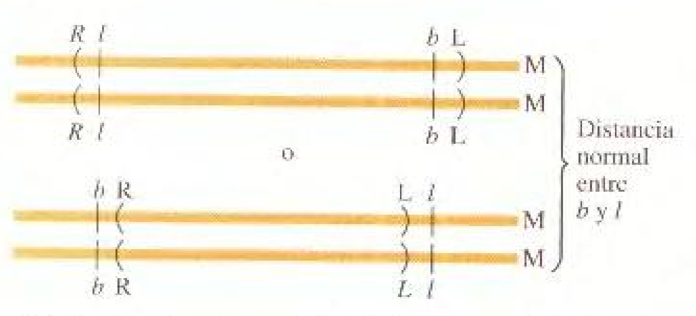
f. ¿Cómo comprobaría su modelo?

♦ Solución ♦

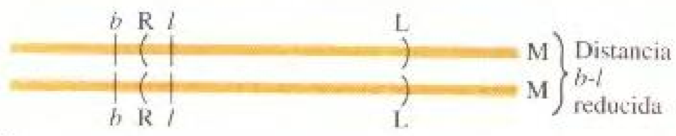
En este problema, como en muchos análisis genéticos, los datos contienen una pista importante; una vez que se ha dado con ella los detalles de los resultados experimentales van encajando rápidamente. En este caso, la pista es la reducción drástica de la frecuencia de recombinación. Hay pocos mecanismos que puedan explicar esta reducción. En este cap tudiado principalmente dos: las inversiones y las este problema, sin embargo, la hipótesis de la de

improbable, por dos razones. En primer lugar, está claro que la línea pura M es viable, y hemos visto que las deleciones grandes no son, por lo general, viables en homocigosis. En segundo lugar, la frecuencia de recombinación es normal en la línea M, y esto no encaja con una deleción. Esto nos lleva a aceptar la hipótesis básica de que la línea M es portadora de una inversión grande que cubre toda o la mayor parte de la región *b-l*. Inicialmente, podríamos considerar la posibilidad de que un locus esté dentro y el otro fuera de la inversión, pero esto no explicaría los valores obtenidos en los cruzamientos dentro de la línea M (véase respuesta a la parte a). Podemos realizar esquemas coherentes con nuestro modelo, utilizando las letras R y L para indicar los extremos normales derecho e izquierdo del fragmento que estaría invertido en M, y *b* y *l* para indicar la posición de los loci.

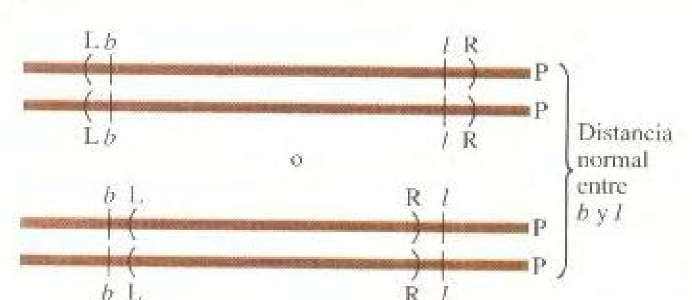
a.



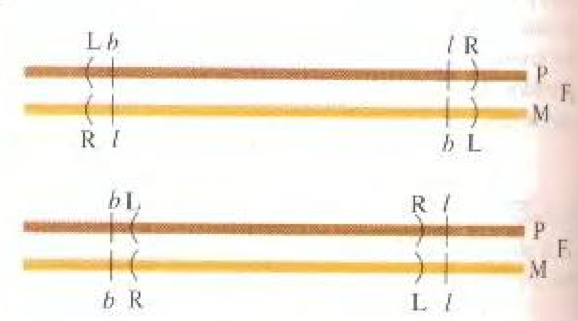
Advierta que, si solo uno de los loci estuviera incluido en la inversión y el otro estuviera fuera, no detectaríamos la distancia de mapa normal. Por ejemplo:



b.



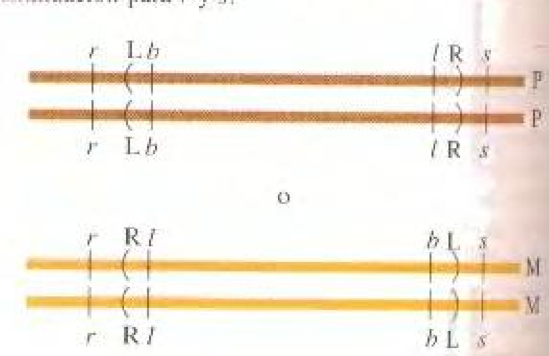
c.



d. La misma F_1 que en el apartado c. No importa cuál de las dos líneas utilicemos en el cruzamiento de prueba.

e. Hemos venido considerando dos alternativas básicas. En la primera, los recombinantes habrían tenido que producirse por entrecruzamientos dobles: uno entre los dos loci y otro fuera de los loci pero dentro de la inversión. (Advierta que un entrecruzamiento doble entre las mismas cromátidas no crea un puente dicéntrico). En la segunda alternativa, los recombinantes procederían de entrecruzamientos simples en la pequeña parte de la región *b—l* que no está incluida en la inversión.

f. Una sencilla prueba citológica es buscar bucles de inversión en meiosis o, si se dispone de marcadores cromosómicos tales como constricciones o bandas, buscar la inversión en cromosomas mitóticos. Para realizar una prueba genética, se podría estudiar la relación de ligamiento entre los loci incluidos en la inversión y marcadores cromosómicos fuera de ella, como se muestra a continuación para *r* y *s*:



En la línea normal P, *b* debería estar situado cerca de *r*; en la línea M, *b* debería quedar cerca de *s*.

PROBLEMAS

1. Indique qué rasgos (genéticos o citológicos) son comunes y cuáles no lo son entre: **(a)** deleciones; **(b)** duplicaciones; **(c)** inversiones; **(d)** translocaciones recíprocas.

2. Normalmente, los dos loci *P* y *Bz* están separados 36 u.m. en el brazo izquierdo de un cromosoma concreto de una planta. Si se produce una inversión paracéntrica que afecta a la cuarta parte de esta región sin incluir a los loci, ¿qué frecuencia de recombinación aproximada entre estos loci predeciría en plantas que fueran: **(a)** heterocigóticas para la inversión paracéntrica? **(b)** homocigóticas para la inversión paracéntrica?

3. Suponga que, en *Drosophila*, los siguientes loci están ligados en el orden *a—b—c—d—e—f*. Una mosca de genotipo *a b c d e f/a b c d e f* se cruza con otra mosca de una línea silvestre. Aproximadamente la mitad de la descendencia es de fenotipo completamente silvestre, pero la otra mitad

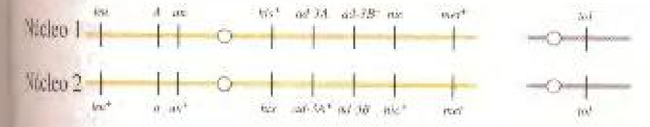
muestra el fenotipo recesivo para los marcadores *d* y *e*. Proponga una explicación para estos resultados.

4. La secuencia normal de un cromosoma determinado de *Drosophila* es 123 · 456789, donde el punto representa el centrómero. Algunas aberraciones cromosómicas aisladas presentan las siguientes estructuras: **(a)** 123 · 476589, **(b)** 123 · 46789, **(c)** 1654 · 32789, **(d)** 123 · 4566789. Diga a qué tipo de mutación cromosómica corresponde cada una y dibuje diagramas que indiquen cómo aparearía cada una de ellas con el cromosoma normal.

5. Se construye un heterocarionte de *Neurospora* entre células con los genotipos que aparecen en el esquema mostrado abajo. En este caso, *leu*, *his*, *ade*, *nic* y *met* son alelos recesivos que generan requerimientos nutricionales específicos para el crecimiento. *A* y *a* son los alelos que determinan el tipo de apareamiento (para que ocurra un cruzamiento, un parental debe ser *A* y el otro *a*). Generalmente, un núcleo *A* no emparejaría con un núcleo *a* para formar un heterocarionte, pero la mutación recesiva *tol* suprime esta incompatibilidad, y permite el crecimiento del heterocarionte en medio vegetativo. El alelo recesivo *un* impide el crecimiento del hongo a 37 °C (es un alelo sensible a la temperatura) y este fenotipo no puede corregirse por cambios en el medio nutritivo. Este heterocarionte crece bien en medio mínimo, así como la mayoría de las células que derivan mitóticamente de él. Sin embargo, algunas células poco frecuentes presentan las siguientes características:

- No crecen en medio mínimo a menos que se enriquezca con leucina.
- Cuando las células se transfieren a un medio que induce el cruzamiento, éste no ocurre (no aparea).
- No crecen cuando se trasladan a 37 °C *aunque* se añada leucina.
- Cuando se añaden células haploides *a* silvestres a estas células aberrantes, sí ocurre cruzamiento, pero la adición de *A* no tiene como resultado el apareamiento.
- Del cruzamiento con el tipo *a* silvestre, se recupera descendencia con el genotipo del núcleo 1, pero nunca con alelos del núcleo 2.

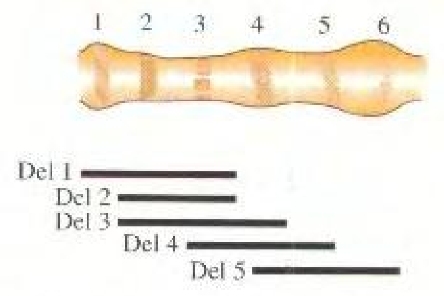
Proponga una explicación sobre el origen de estas células raras en el heterocarionte original, y sobre las observaciones relacionadas con ellas.



6. Algunos ratones denominados *waltzers* tienen una forma curiosa de andar. La diferencia entre los ratones normales y los waltzers es genética, siendo éste un carácter recesivo. W. H. Gates cruzó ratones waltzer con ratones normales homocigóticos y entre varios centenares de descendientes normales encontró un solo ratón waltzer (una hembra). Cuando la cruzó con un macho waltzer, toda la descendencia fue waltzer. Cuando la cruzó con un macho normal homocigótico, toda la descendencia fue normal. Se cruzaron entre sí algunos machos y hembras de esta descendencia normal, y entre los descendientes no se observó ningún individuo waltzer. Painter examinó los cromosomas de los ratones waltzer obtenidos en algunos de los cruzamientos de Gates y que mostraban un comportamiento similar al de la hembra original waltzer rara. Encontró que estos individuos tenían 40 cromosomas, como ocurría en los ratones normales o en los ratones waltzer convencionales. En los waltzer raros, sin embargo, uno de los cromosomas de un par era anormalmente corto. Dé una interpretación genética y citológica a estas observaciones, tan completa como sea posible. (El problema 6 se ha extraído de A. M. Srb, R. D. Owen y R. S. Edgar, *General Genetics*, 2.ª ed. Copyright © 1965 de W. H. Freeman & Company).

7. En *Neurospora crassa*, es relativamente fácil conseguir mutantes del gen *ad-3B* debido a que, además de ser auxótrofos para la adenina, presentan coloración púrpura. En cultivos haploides, se obtuvieron 100 mutantes *ad-3B* espontáneos. A continuación, se sembraron células de cada uno de ellos en medio sin adenina para buscar revertientes. De 13 cultivos probados, ninguno produjo colonias, incluso después de siembras intensivas tras el tratamiento con una amplia variedad de mutágenos. ¿Cuál es el origen más probable de estos mutantes? Dé una explicación tanto a la falta de reversibilidad como a la viabilidad de estas estirpes en la condición haploide.

8. En la figura se muestran seis bandas de un cromosoma de las glándulas salivales de *Drosophila* y la extensión de cinco deleciones (Del 1 a Del 5):



Se sabe que los alelos recesivos *a*, *b*, *c*, *d*, *e* y *f* están en esta región, aunque se desconoce el orden. Cuando las deleciones se combinan con cada uno de los alelos, se obtienen los siguientes resultados:

	a	*b*	*c*	*d*	*e*	*f*
Del 1	−	−	−	+	+	+
Del 2	−	+	−	+	+	+
Del 3	−	+	−	+	−	+
Del 4	+	+	−	−	−	+
Del 5	+	+	+	−	−	−

En esta tabla, un signo menos significa que la deleción incluye el alelo silvestre correspondiente (la deleción desenmascara al recesivo) y un signo más que el alelo silvestre correspondiente todavía está presente. Utilice estos datos

para inferir qué banda corresponde a cada gen. (Este problema procede de D. L. Hartl, D. Friefelder y L. A. Snyder, *Basic Genetics*, Jones & Bartlett, 1988.)

9. Cinco mutaciones letales recesivas de *Drosophila* están situadas en el cromosoma 2. Se aparea un cromosoma portador de cada una de las mutaciones letales con un cromosoma 2 de una estirpe con seis mutaciones recesivas (*h, i, j, k, l* y *m*), que están distribuidas a lo largo del cromosoma en este orden. El fenotipo de las moscas resultantes se muestra en la tabla, donde M indica fenotipo mutante para un carácter determinado y S fenotipo silvestre.

Mutación letal	Marcador del cromosoma 2					
	h	*i*	*j*	*k*	*l*	*m*
1	M	M	S	S	S	S
2	S	S	S	M	M	S
3	S	S	S	S	S	M
4	S	S	S	M	M	M
5	S	S	S	S	S	S

a. ¿Cuál es el origen más probable de las mutaciones letales 1 a 4?

b. ¿Qué puede decir acerca de la mutación letal número 5?

10. Dos líneas puras de maíz presentan frecuencias de recombinación diferentes en la región que incluye desde *P1* hasta *sm*, en el cromosoma 6. La estirpe normal (A) muestra una RF del 26 %, y la estirpe anormal (B) muestra una RF del 8 %. Cuando se cruzan las dos líneas se producen híbridos que son semiestériles.

a. Decida entre una inversión y una deleción como posibles causas alternativas de la baja RF presentada por la estirpe anormal. Explique su decisión.

b. Haga un esquema de la relación aproximada entre la aberración cromosómica y los marcadores genéticos.

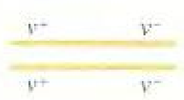
c. ¿Por qué los híbridos son semiestériles?

11. En una mosca de la fruta de genotipo *P Bar Q*/*p Bar q*, los loci *P* y *Q* representan marcadores que flanquean la mutación homocigótica *Bar* a pequeña distancia por la derecha y por la izquierda. En un cruzamiento de prueba diseñado para determinar los productos meióticos de dicha mosca, se obtienen, con baja frecuencia, algunas moscas con ojos normales y algunas doble-bar. Éstas presentan las combinaciones *P q* o *p Q* para los marcadores que flanquean la mutación. Utilice diagramas para explicar:

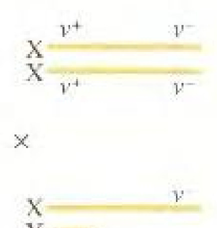
a. El origen de las moscas normales y doble-bar poco frecuentes.

b. La asociación de las moscas normales y de ojos doble bar con los genotipos de los marcadores que flanquean la mutación.

12. Se obtiene una línea pura de *Drosophila*, portadora de una duplicación de un segmento del cromosoma X que contiene el gen que determina ojos color bermellón. La estirpe es



y tiene color de ojos silvestre. Se cruzan hembras de esta estirpe con machos de ojos color bermellón que no contienen la duplicación:



En la descendencia, todos los machos tienen ojos normales y todas las hembras ojos color bermellón. (**a**) Explique por qué son sorprendentes estos resultados en relación con la teoría de la dominancia. Explique los fenotipos siguientes: (**b**) de los parentales masculino y femenino, (**c**) de los descendientes machos y hembras.

13. Se ha encontrado una mosca del vinagre heterocigótica para una inversión paracéntrica. Sin embargo, después de numerosos cruzamientos, ha sido imposible obtener moscas homocigóticas para la inversión. ¿Cuál es la explicación más probable de este resultado?

14. En *Neurospora*, el locus *un3* está situado en el cromosoma 1, justo a la izquierda del centrómero, y siempre segrega en la primera división meiótica. El locus *ad3* está a 10 u.m. a la derecha del centrómero.

a. Asumiendo que en la región *un3*—*ad3* sólo ocurren entrecruzamientos sencillos o bien no ocurren entrecruzamientos, ¿qué ascas lineales se esperarían y con qué frecuencias en un cruzamiento normal de *un3 ad3* × silvestre?

b. La mayoría de las veces estos cruzamientos se comportan como se esperaría, pero en una ocasión se cruza una estirpe normal *un3 ad3* con una estirpe silvestre procedente de un campo de caña de azúcar de Hawai. Los resultados son los siguientes:

• *un3 ad3*	• *un3 ad3*
• *un3 ad3*	• *un3 ad3*
• *un3 ad3*	abortan
• *un3 ad3*	abortan
• $un3^+$ $ad3^-$	abortan
• $un3^+$ $ad3^-$	abortan
• $un3^+$ *ad3*	• $un3^+$ $ad3^+$
• $un3^+$ $ad3^-$	• $un3^+$ $ad3^+$
(y su versión invertida) 80%	(y otros órdenes de pares de esporas) 20%

Busque una explicación a estos resultados y comente cómo podría probarla.

15. Una planta de petunia es heterocigótica para los siguientes autosomas homólogos:

A • *B* *C* *D* *E* *F* *G* *H* *I*

a • *b* *c* *d* *h* *g* *f* *e* *i*

a. Dibuje el aspecto de los cromosomas apareados en metafase I y marque todas las partes del esquema. Numere las cromátidas secuencialmente, de arriba hacia abajo de la página.

b. Suponga que se produce un doble entrecruzamiento que afecta a tres cromátidas, con un primer entrecruzamiento entre los loci *C* y *D* de las cromátidas 1 y 3, y otro entre los loci *G* y *H* de las cromátidas 2 y 3. Haga un esquema de los resultados de estos hechos de recombinación, tal como los observaría en anafase I, incluyendo toda la información posible en su diagrama.

c. Dibuje la configuración cromosómica que observaría en anafase II después de los entrecruzamientos descritos en la parte b.

d. Indique cuáles serían los genotipos de los gametos de esta meiosis que darían lugar a descendencia viable. Suponga que todos los gametos se fecundan con polen que presenta el siguiente orden genético: *A B C D E F G H I*.

16. Un individuo heterocigótico para una inversión tiene un cromosoma con el siguiente mapa de ligamiento:



El otro cromosoma posee una inversión que incluye los genes *c*, *d*, *e* y *f*.

a. ¿De qué tipo de inversión se trata?

b. Dibuje la configuración de estos cromosomas en la sinapsis.

c. Si se produce un doble entrecruzamiento entre cuatro cromátidas en las regiones *c—d* y *e—f*, ¿cuáles serán los productos meióticos?

d. Repita en el caso de un entrecruzamiento entre tres cromátidas en las mismas regiones.

e. ¿Presentará alguno de los productos meióticos un cariotipo normal? Explíquelo.

17. Los orangutanes están en peligro de extinción en su hábitat natural (las islas de Borneo y Sumatra), de manera que se ha establecido un programa de reproducción de orangutanes cautivos en zoos de todo el mundo. Parte de este programa incluye una investigación sobre la citogenética de los orangutanes. La investigación ha demostrado que todos los orangutanes de Borneo poseen una forma del cromosoma 2 distinta de la de todos los de Sumatra, como se muestra en el esquema adjunto. Antes de que esta diferencia fuera conocida, se realizaron algunos cruzamientos entre animales de islas diferentes, y ahora hay 14 descendientes híbridos criándose en cautividad.

q3.1 q2.2 q2.1 q1.2 q1.1 cen p1.1 p1.2 — Borneo

q3.1 q2.2 q2.1 p1.1 cen q1.1 q1.2 p1.2 — Sumatra

a. ¿Qué término o términos describen las diferencias entre estos cromosomas?

b. Dibuje los cromosomas 2 de un orangután híbrido, emparejados durante la primera profase meiótica. Asegúrese de mostrar todos los marcadores cromosómicos indicados en el esquema adjunto, y marque todas las partes de su dibujo.

c. En el 30 % de las meiosis habrá un entrecruzamiento en algún lugar de la región comprendida entre las bandas p1.1 y q1.2. Dibuje los cromosomas 2 gaméticos que se formarán en una meiosis en la que ocurra un único entrecruzamiento dentro de la banda q1.1.

d. Si ésta fuera la única diferencia cromosómica entre los parentales, ¿qué fracción de los gametos producidos por un orangután híbrido generarán descendencia viable?

(Problema 17 cortesía de Rosemary Redfield.)

18. Dos grupos de genetistas, en California y en Chile, inician un trabajo para construir un mapa de ligamiento de un díptero. Ambos han identificado de forma independiente los loci que determinan el color del cuerpo (*B* = negro, *b* = gris) y la forma del ojo (*R* = circular, *r* = estrellado), que están separados 28 u.m. Como resultado del intercambio de estirpes entre ambos grupos, se obtuvieron los resultados que se muestran a continuación:

Cruzamiento	F_1	Descendencia de F_1 × cualquier *b r/b r*	
B R/B R (Calif.)	*B R/b r*	*B R/b r*	36 %
		b r/b r	36
× *b r/b r* (Calif.)		*B r/b r*	14
		b R/b r	14
B R/B R (Chile)	*B R/b r*	*B R/b r*	36
		b r/b r	36
× *b r/b r* (Chile)		*B r/b r*	14
		b R/b r	14
B R/B R (Calif.)	*B R/b r*	B R/*b r*	48
		b r/b r	48
× *b r/b r* (Chile)		*B r/b r*	2
o		*b R/b r*	2
b r/b r (Calif.)			
× *B R/B R* (Chile)			

a. Proponga una hipótesis genética que explique los resultados de los tres cruzamientos de prueba.

b. Dibuje los rasgos cromosómicos característicos de la meiosis en la F_1 de un cruzamiento entre las estirpes de California y Chile.

19. *Drosophila* puede encontrarse en cualquier parte del mundo. Un genetista que estudia ligamiento en el cromosoma 2 obtiene una estirpe pura de Okanagan Valley (Canadá) y otra de España. Realiza cruzamientos con machos y hembras de la misma estirpe y analiza los rasgos asociados a seis loci (*a*—*f*) del cromosoma 2 en los dos grupos de descendientes. Obtiene las siguientes frecuencias de recombinación (en porcentajes), donde I representa segregación independiente, es decir, RF = 50:

Okanagan:

	a	*b*	*c*	*d*	*e*	*f*
a	0	12	14	23	3	29
b		0	2	35	15	17
c			0	37	17	15
d				0	20	I
e					0	32
f						0

España:

	a	*b*	*c*	*d*	*e*	*f*
a	0	12	7	30	3	22
b		0	19	18	15	34
c			0	37	4	15
d				0	33	I
e					0	19
f						0

a. Analice los datos en relación con la disposición cromosómica de estos loci en las moscas de cada área geográfica, y dé una explicación a la(s) diferencia(s) que encuentre. Dibuje un mapa genético con cada grupo de datos, indicando las distancias de mapa.

b. Indique qué frecuencias de recombinación se esperarían en las cinco regiones cromosómicas delimitadas por estos loci en híbridos Okanagan-España.

20. Cuando se lleva a cabo un cruzamiento de prueba con una planta aberrante de maíz se obtienen los siguientes valores de RF:

	INTERVALO				
	d-f	*f-b*	*b-x*	*x-y*	*y-p*
Valores control	5	18	23	12	6
Planta aberrante	5	2	2	0	6

(El orden de los loci es centrómero-*d-f-b-x-y-p*). La planta aberrante es sana, pero produce muchos menos óvulos y polen que la planta control.

a. Proponga una hipótesis que dé explicación a los valores anormales de las frecuencias de recombinación y a la reducción en la fertilidad.

b. Utilice diagramas para explicar el origen de los recombinantes según su hipótesis.

21. Los siguientes loci de maíz se encuentran en un brazo del cromosoma 9 en el orden en el que se indican a continuación (las distancias entre ellos se muestran en unidades de mapa):

c——*bz*—*wx*——*sh*——*d*—— centrómero
12 8 10 20 10

C da lugar a aleurona coloreada; *c* a aleurona blanca.
Bz da lugar a hojas verdes; *bz* a hojas de color bronce.
Wx da lugar a semillas con un elevado contenido en almidón; *wx* con poco almidón.
Sh da lugar a semillas lisas; *sh* a semillas rugosas.
D da lugar a plantas altas; *d* a plantas enanas.

Una planta de una estirpe homocigótica para los cinco alelos recesivos se cruza con otra planta silvestre procedente de México que es homocigótica para los cinco alelos dominantes. Los individuos de la generación F_1 expresan todos los alelos dominantes, y cuando se realiza un cruzamiento de prueba con el parental recesivo, encontramos en la descendencia los siguientes fenotipos:

Coloreada, verde, elevado contenido en almidón, lisa, alta	360
Blanca, bronce, bajo contenido en almidón, rugosa, enana	355
Coloreada, bronce, bajo contenido en almidón, rugosa, enana	40
Blanca, verde, elevado contenido en almidón, lisa, alta	46
Coloreada, verde, elevado contenido en almidón, lisa, enana	85
Blanca, bronce, bajo contenido en almidón, rugosa, alta	84
Coloreada, bronce, bajo contenido en almidón, rugosa, alta	5
Blanca, verde, elevado contenido en almidón, lisa, enana	9
Coloreada, verde, bajo contenido en almidón, lisa, alta	7
Blanca, bronce, elevado contenido en almidón, rugosa, enana	6

Proponga una hipótesis que explique los resultados. Incluya los siguientes datos:

a. una exposición general de su hipótesis, dibujando diagramas si es necesario.

b. por qué aparecen 10 clases fenotípicas.

c. una explicación del origen de cada clase, incluyendo su frecuencia.

d. una forma, al menos, de comprobar su hipótesis.

22. Una genetista dedicada al estudio de *Drosophila* tiene una estirpe de moscas que es una línea pura y silvestre. Ella cruza esta estirpe con otra marcada de forma apropiada en el cromosoma X, portadora de los alelos recesivos *y* (amarillo), *cv* (sin venas transversales), *v* (bermellón), *f* (bifurcado) y *car* (encarnado), que están distribuidos regularmente a lo largo del cromosoma. Recoge las hembras heterocigóticas de la F_1 y las aparea con machos *y cv f B car* (*B* = bar u ojo rasgado). Entre los machos de la descendencia se obtienen las siguientes clases:

1. $y\ cv\ v\ f\ car$
2. $y^+\ cv^+\ v^+\ f^+\ car^+$
3. $y\ cv^+\ v^+\ f^+\ car$
4. $y^+\ cv\ v\ f\ car^+$
5. $y\ cv\ v^+\ f\ car$
6. $y^+\ cv^+\ v\ f^+\ car^+$
7. $y\ cv\ v^+\ f^+\ car$
8. $y^+\ cv^+\ v\ f\ car^+$
9. $y\ cv^+\ v^+\ f\ car$
10. $y^+\ cv\ v\ f^+\ car^+$
11. $y\ cv\ v\ f\ B\ car$

a. Explique los resultados de las clases 1 a 10.

b. ¿Cómo explicaría la clase 11?

c. ¿Cómo probaría su hipótesis?

(Problema 22 es cortesía de Tom Kaufman.)

*23. Suponga que le entregan una línea de *Drosophila* de la cual puede obtener machos y hembras vírgenes en cualquier momento. La línea es homocigótica para un cromosoma 2 portador de una inversión que impide los entrecruzamientos, un alelo dominante (*Cu*) que determina las alas curvadas y un alelo recesivo (*pr*, púrpura) que determina ojos oscuros. El cromosoma se puede dibujar como



Posee esperma irradiado de un macho silvestre y desea determinar si han sido inducidas mutaciones letales recesivas en el cromosoma 2. ¿Cómo lo haría? (**Sugerencia:** recuerde que cada espermatozoide posee un cromosoma 2 irradiado *diferente*). Indique el tipo y el número de las moscas utilizadas en cada cruce.

24. Indique las formas cromosómicas que se producirán en la anafase 1 de la meiosis en un heterocigoto para una translocación recíproca que sufre: **(a)** segregaciones alternadas y **(b)** segregación adyacente de tipo 1.

25. Los loci *a* y *b* de *Neurospora* están situados en cromosomas distintos. En un cruzamiento de una estirpe a ; b con una estirpe silvestre aislada de la naturaleza, se obtiene la siguiente descendencia: a ; b, 45 %; a^+; b^+, 45 %; a; b^+, 5 %; a^+ ; b, 5 %. Interprete estos resultados y explique el origen de todas las clases observadas en la descendencia según su hipótesis.

26. La mutación alas rizadas (*Cy*) de *Drosophila* es dominante y está situada en el cromosoma 2. Un macho Cy/Cy^+ es irradiado con rayos X y posteriormente cruzado con hembras Cy^+/Cy^+. Los hijos Cy/Cy^+ se cruzan con hembras Cy/Cy^+. La descendencia de uno de los cruzamientos es:

machos con alas rizadas	146
machos silvestres	0
hembras con alas rizadas	0
hembras silvestres	163

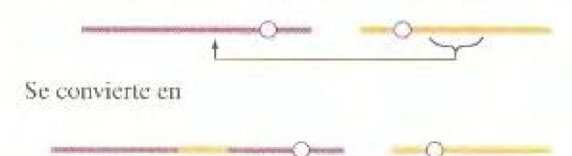
¿Qué tipo de anomalía en la estructura cromosómica sería la explicación más probable a estos resultados? En su explicación, utilice diagramas cromosómicos de todas las estirpes mencionadas en el problema. (**Sugerencia**: recuerde que no se produce recombinación en los machos de *Drosophila*).

27. Descubre un macho de *Drosophila* que es heterocigótico para una translocación recíproca entre los cromosomas 2 y 3. Cada punto de ruptura está cercano al centrómero, situado cerca del centro de cada uno de estos cromosomas metacéntricos.

a. Dibuje un diagrama en el que se muestre cómo aparean estos cromosomas durante la meiosis.

b. Encuentra que esta mosca presenta los alelos recesivos *bw* (ojos marrones) y *e* (cuerpo ébano) en los cromosomas 2 y 3 no translocados, respectivamente, y los alelos silvestres en los translocados. La mosca se cruza con una hembra que tiene cromosomas normales y es homocigótica para *bw* y *e*. ¿Qué tipo de descendencia esperaría y en qué proporción? (**Sugerencia:** recuerde que los cigotos que poseen un brazo cromosómico extra o son deficientes para algún cromosoma no sobreviven. No existe recombinación en los machos de *Drosophila*).

28. Una translocación *insercional* consiste en la inserción de una porción de la región central de un cromosoma en el centro de otro cromosoma (no homólogo). Según esto



¿Cómo emparejarán en la meiosis las combinaciones que sean heterocigóticas para tales translocaciones? En el caso de un cruce entre una estirpe silvestre de *Neurospora* y una portadora de dicha translocación, ¿qué patrón de esporas no viables se producirán y en qué proporciones relativas? (**Sugerencia:** recuerde que las esporas con duplicaciones cromosómicas sobreviven y se tornan oscuras, mientras que las esporas con deficiencias son de color claro e inviables).

29. En el maíz, los genes para la longitud del penacho de la mazorca (alelos *T* y *t*) y la resistencia a la roya (*R* y *r*) están situados en cromosomas distintos. Llevando a cabo cruzamientos rutinarios, un mejorador observó que una planta T/t ; R/r mostraba unos resultados inesperados cuando, en el cruzamiento de prueba, se empleaba el polen del parental doble homocigoto recesivo t/t ; r/r. Los resultados eran:

Descendencia	T/t ; R/r	98
	t/t ; r/r	104
	T/t ; r/r	3
	t/t ; R/r	5

Mazorcas: el número de granos es aproximadamente la mitad de lo usual.

a. ¿Qué aspectos claves de los datos son diferentes de los resultados esperados?

b. Indique una hipótesis precisa que explique los resultados.

c. Indique los genotipos de los parentales y los descendientes.

d. Dibuje un diagrama de la disposición de los alelos en los cromosomas.

e. Explique el origen de las dos clases de descendientes con 3 y 5 individuos.

El problema paso a paso

1. ¿Qué significa «gen de longitud del penacho» y «gen de resistencia a la roya»?

2. ¿Importa que no se indique el significado preciso de los símbolos alélicos *T, t, R, r*? ¿Por qué?

3. De la forma como se emplean aquí, ¿cómo se relacionan los términos *gen* y *alelo* con los conceptos locus y par génico? (Trazar una mapa de conceptos sería una buena forma de responder a esta pregunta).

4. ¿Qué pruebas experimentales anteriores darían a los genetistas del maíz la idea de que los dos genes están en cromosomas distintos?

5. ¿Qué piensa usted que son los «cruzamientos rutinarios» para un mejorador del maíz?

6. ¿Qué término se utiliza para describir los genotipos del tipo *T/t ; R/r*?

7. ¿Qué es el «polen parental»?

8. ¿Qué son los cruzamientos de prueba y por qué los genetistas los encuentran tan útiles?

9. ¿Qué tipos de descendientes y qué frecuencias podría haber esperado el mejorador del cruzamiento de prueba?

10. Describa en qué forma difiere la descendencia observada de la esperada.

11. ¿Qué le dice la relativa igualdad de las dos primeras clases de la descendencia?

12. ¿Qué nos dice la relativa igualdad de las otras dos clases de descendientes?

13. ¿Cuáles eran los gametos de la planta inusual, y cuáles eran sus proporciones?

14. ¿Qué gametos constituían la mayoría?

15. ¿Qué gametos eran la minoría?

16. ¿Qué descendientes parecen ser recombinantes?

17. ¿Qué combinaciones alélicas parecen estar ligadas de alguna forma?

18. ¿Cómo puede existir ligamiento entre dos genes situados supuestamente en cromosomas distintos?

19. ¿Qué le dicen las clases mayoritarias y minoritarias sobre el genotipo de los parentales de la planta inusual?

20. ¿Qué es una mazorca de maíz?

21. ¿Qué aspecto tiene una mazorca de maíz normal? (Dibuje una y márquela con leyendas).

22. ¿Qué aspecto tiene una mazorca de maíz de este cruzamiento? (Dibuje una).

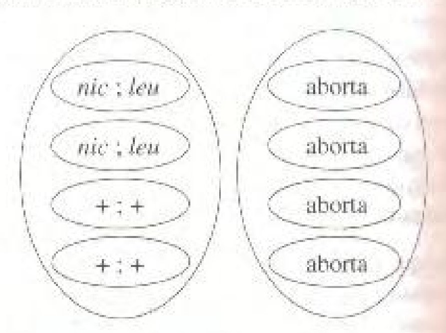
23. ¿Qué es exactamente un grano de maíz?

24. ¿Qué efecto podría explicar la ausencia de la mitad de los granos?

25. ¿Murieron la mitad de los granos? Si fuese así, ¿se debió la muerte al parental masculino o al femenino?

Ahora trate de resolver el problema.

30. El hongo ascomiceto *Schizosaccharomyces pombe* produce tétradas desordenadas. Se realizó un cruzamiento entre una estirpe estándar de laboratorio de genotipo *nic-2 ; leu-3* y una estirpe silvestre aislada de las uvas. Estudios genéticos previos con la estirpe de laboratorio, mostraban que *nic-2* se sitúa en el cromosoma 1 y *leu-3* en el cromosoma 4. Por lo tanto, resultó sorprendente que, cuando se analizaron aproximadamente 100 tétradas, tan sólo aparecieron dos tipos de ellas con igual frecuencia, que fueron:



a. ¿Cuál era el resultado esperado de este cruzamiento?

b. Proponga una hipótesis genética para los resultados observados, mostrando claramente los genotipos de los parentales y las ascosporas con su modelo, y explicando por qué hay sólo dos tipos de ascas con la misma frecuencia.

(**Nota:** en este hongo, todos los genomas con deleciones o duplicaciones y deleciones dan lugar a abortos durante la meiosis).

31. En el maíz, el locus *g* (+ = hojas púrpura, *g* = hojas verdes) está situado en el cromosoma 2, y el locus *w* (+ = semillas con mucho almidón, *w* = poco almidón) en el cromosoma 9. Un homocigoto silvestre muestra unos resultados inusuales en un cruzamiento rutinario en el que están implicados estos marcadores. En un análisis, se cruzó el homocigoto con una planta de hojas verdes y semillas con poco almidón, siendo la descendencia F_1 silvestre, pero aproximadamente la mitad de los óvulos y el polen abortó. Se retrocruzó la F_1, y de 50 descendientes, 28 fueron de hojas verdes, con semillas con poco almidón y una producción normal de gametos; y 22 plantas fueron silvestres, presentando un 50 % de gametos abortados.

a. Proponga una explicación a estos resultados utilizando diagramas de los parentales, la F_1 y la descendencia.

b. Si la F_1 se autofecundara, ¿qué fenotipos resultarían y en qué proporciones?

32. La aparición del cuerpo amarillo en *Drosophila* se debe al alelo mutante *e* de un gen situado en el extremo superior

del cromosoma X (el alelo silvestre da lugar a cuerpo gris). En un experimento, se irradió un macho con rayos X y, posteriormente, se cruzó con una hembra de cuerpo amarillo. Muchos de los descendientes machos fueron amarillos, lo esperado, pero cuando se llevó a cabo un escrutinio en cientos de moscas, se encontraron dos machos que presentaron cuerpo gris (fenotípicamente silvestres). Estos dos machos se cruzaron con hembras de cuerpo amarillo, obteniéndose los siguientes resultados:

	Descendencia
macho gris 1 × hembra amarilla	todas las hembras amarillas todos los machos grises
macho gris 2 × hembra amarilla	$\frac{1}{2}$ hembras amarillas $\frac{1}{2}$ hembras grises $\frac{1}{2}$ machos amarillos $\frac{1}{2}$ machos grises

a. Explique el origen y el comportamiento en el cruzamiento del macho 1.

b. Explique el origen y el comportamiento en el cruzamiento del macho 2.

33. Dos mutaciones auxotróficas en *Neurospora*, *ad-3* y *pan-2*, se localizan en los cromosomas 1 y 6, respectivamente. En el laboratorio, se aísla una estirpe *ad-3* inusual que muestra los siguientes resultados:

	Aspecto de ascospora	RF entre *ad-3* y *pan-2*
1. *ad-3* normal × *pan-2* normal	Todas negras	50 %
2. *ad-3* inusual × *pan-2* normal	Alrededor de $\frac{1}{2}$ negras y $\frac{1}{2}$ blancas (inviables)	1 %

3. De las ascosporas negras del cruzamiento 2, alrededor de la mitad eran completamente normales y la otra mitad repetía el comportamiento de la estirpe *ad-3* original de comportamiento inusual.

Explique los resultados obtenidos con la ayuda de esquemas claros. (**Nota:** en *Neurospora*, las ascosporas que presentan material cromosómico extra sobreviven y toman color negro normal, mientras las que pierden alguna región cromosómica son blancas e inviables).

34. Las plantas de maíz que poseen el alelo *P* desarrollan hojas púrpura, y las homocigóticas para el alelo *p*, hojas verdes. El locus *P* está situado en el brazo largo del cromosoma 9 a 20 u.m. del centrómero. Se cruzó una planta homocigótica *p/p* con otra homocigótica *P/P* que presentaba una translocación recíproca, estando situado el punto de ruptura en el brazo largo del cromosoma 9 a 30 u.m. del centrómero. Se realizó el cruzamiento de prueba entre la F_1 obtenida y el parental *p/p*. Prediga qué proporción de la descendencia de este cruzamiento será:

a. Verde, semiestéril.

b. Verde, completamente fértil.

c. Púrpura, semiestéril.

d. Púrpura, completamente fértil.

e. Si se lleva a cabo la autofecundación de la F_1, ¿qué proporción de la descendencia será verde y completamente fértil?

35. Plantas de maíz cromosómicamente normales presentan un locus *p* en el cromosoma 1 y un locus *s* en el cromosoma 5.

P da lugar a hojas de color verde oscuro; *p*, verde claro. *S* produce mazorcas grandes; *s*, mazorcas pequeñas.

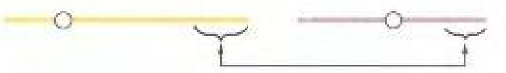
Una planta original de genotipo *P/p* ; *S/s* muestra el fenotipo esperado (hojas de color verde oscuras y mazorcas grandes), pero da resultados inesperados en los cruzamiento que se detallan a continuación:

- Cuando se autofecunda, la fertilidad es normal, pero la frecuencia del tipo *p/p* ; *s/s* es $\frac{1}{4}$ (en lugar de $\frac{1}{16}$, lo esperado).
- Cuando se hace un cruzamiento de prueba con una estirpe normal de genotipo *p/p* ; *s/s*, la generación F_1 resultante es $\frac{1}{2}$ *P/p* ; *S/s* y $\frac{1}{2}$ *p/p* ; *s/s*, siendo la fertilidad normal.
- Cuando se lleva a cabo el cruzamiento entre una planta *P/p* ; *S/s* de la F_1 y una planta normal *p/p* ; *s/s*, se aprecia semiesterilidad, pero de nuevo la descendencia es $\frac{1}{2}$ *P/p* ; *S/s* y $\frac{1}{2}$ *p/p* ; *s/s*.

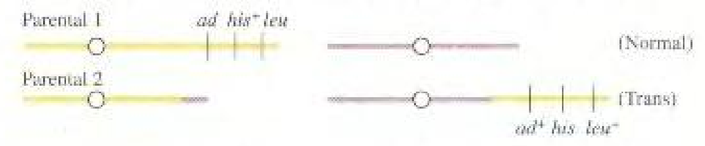
Explique estos resultados, mostrando los genotipos completos de la planta original, de la utilizada en los cruzamientos de prueba y de las plantas F_1. ¿Cómo comprobaría su hipótesis?

36. Se cruza una planta de maíz *pr/pr* de cromosomas normales con una planta *Pr/Pr* homocigótica para una translocación recíproca entre los cromosomas 2 y 5. La F_1 es semiestéril y de fenotipo Pr (color de la semilla). El cruzamiento de prueba con el parental de cromosomas normales da como resultado 764 Pr semiestériles, 145 pr semiestériles, 186 Pr normales y 727 pr normales. ¿Cuál es la distancia entre el locus *Pr* y el punto de la translocación?

37. En *Neurospora*, se obtiene una translocación recíproca del siguiente tipo:



A continuación se realiza el siguiente cruzamiento:



Asumiendo que el pequeño segmento cromosómico de color púrpura implicado en la translocación no incluye nin-

	EMBRIONES (MEDIA)			
Cruzamiento	Implantados en la pared uterina	Degeneran después de la implantación	Normales	Degeneración (%)
♂ anormal × ♀ normal	8.7	5.0	3.7	57.5
♂ normal × ♀ normal	9.5	0.6	8.9	6.5

gún gen esencial, ¿cómo seleccionaría productos de la meiosis que tuvieran una duplicación del segmento translocado del cromosoma amarillo?

38. Una rata macho, fenotípicamente normal, presenta determinadas anomalías reproductivas cuando se compara con machos normales, tal como se muestra en la tabla de arriba. Proponga una explicación genética a estos resultados inusuales, e indique cómo podría comprobarse su idea.

39. En la formación de las ascas en *Neurospora*, cualquier ascospora con una deleción aborta y se vuelve blanca, mientras que las que presentan duplicaciones sobreviven como ascosporas de color oscuro. ¿Qué patrones de aborto de ascosporas observaría, y en qué proporciones aproximadas, en las óctadas de *Neurospora* en cruzamientos entre una estirpe con cromosomas normales y otra con

a. una translocación recíproca?

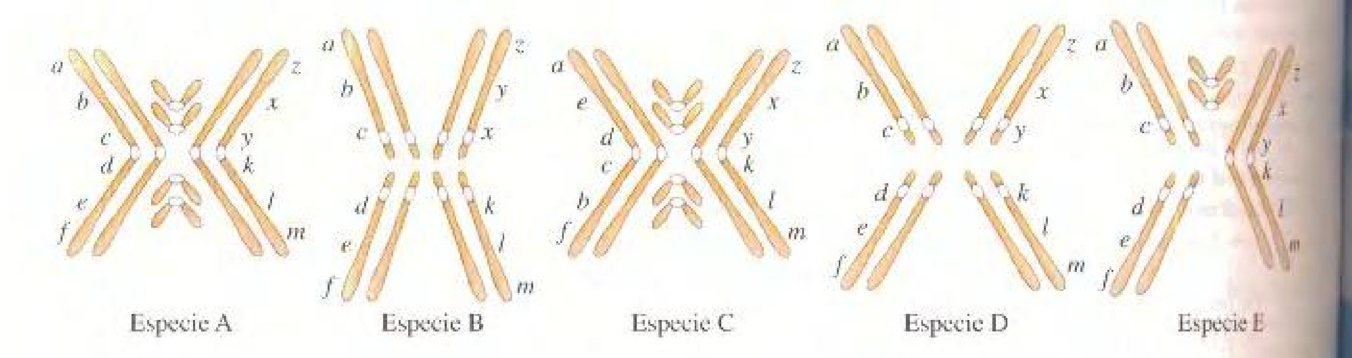
b. una inversión pericéntrica?

c. una inversión paracéntrica?

Asegúrese de tener en cuenta el efecto de la recombinación en cada uno de los casos.

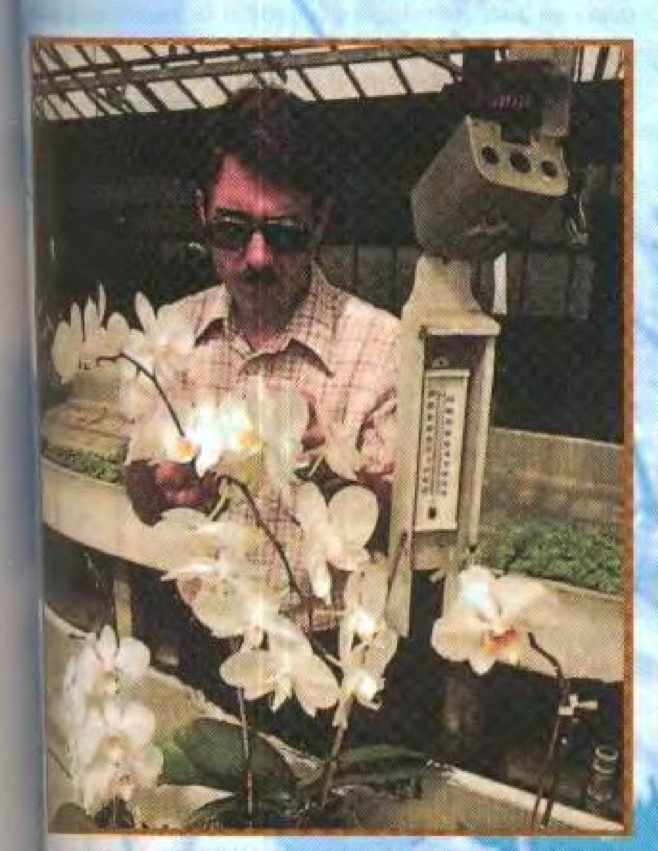
40. Suponga que está estudiando la citogenética de cinco especies íntimamente relacionadas con *Drosophila*. La figura de abajo, muestra el orden de los genes (las letras indican genes que son idénticos en las cinco especies) y los pares de cromosomas que se encuentran en cada especie. Explique de qué modo evolucionaron probablemente estas especies unas a partir de otras, describiendo los cambios ocurridos en cada paso. (**Nota:** asegúrese de comparar el orden de los genes con cuidado).

41. Indique cómo se obtuvo la proporción $\frac{10}{16}$ de la página 538.



18

MUTACIONES CROMOSÓMICAS II: CAMBIOS EN EL NÚMERO DE CROMOSOMAS



genetista **examina una orquídea con múltiples dotaciones** rosómicas **(un poliploide).**
que las dimensiones del poliploide con las de sus parentales oides, mostrados en primer plano. (*Runk/Schoenberger/Grant Heilman.*)

Ideas fundamentales

Los organismos con dotaciones cromosómicas múltiples (poliploides) suelen ser más grandes que los organismos diploides, aunque anomalías en el apareamiento meiótico de los cromosomas en estos organismos poliploides pueden producir esterilidad.

Un número par de dotaciones cromosómicas poliploides es más probable que resulte fértil. En esta condición, las proporciones de segregación para cada locus individual difieren de las de los diploides.

El cruzamiento entre dos especies diferentes y la duplicación subsiguiente del número de cromosomas en el híbrido producen una clase especial de poliploide fértil interespecífico.

Generalmente, las variantes que han ganado o perdido un cromosoma se originan por falta de disyunción (segregación cromosómica anormal en meiosis o mitosis).

Tales variantes tienden a ser estériles y manifiestan anomalías atribuibles al desequilibrio génico.

Cuando son fértiles, estas variantes presentan proporciones anormales de segregación génica únicamente para el cromosoma implicado.

La segunda clase principal de mutación cromosómica es el cambio en el número de cromosomas. Hay pocos aspectos de la Genética que afecten a temas humanos tan directamente como éste. El número de cromosomas varía espontáneamente como consecuencia de accidentes en la maquinaria celular, y este proceso ha venido ocurriendo desde que hay vida en el planeta. De hecho, los cambios en el número de cromosomas han sido elementos clave en la formación de los genomas durante la evolución. Como ejemplos de tales cambios, no hay más que mirar a nuestros propios alimentos, ya que muchas de las plantas (y algunos de los animales) que comemos aparecieron por cambios espontáneos en el número de cromosomas durante la evolución de dichas especies. Hoy en día, los criadores imitan este proceso, manipulando el número de cromosomas para mejorar la productividad o alguna otra característica útil de un organismo. Aunque quizá la importancia del número de cromosomas se centra en los miembros de nuestra especie, en el sentido de que una gran proporción de enfermedades genéticas humanas se deben a la presencia de un número anormal de cromosomas.

En este capítulo estudiaremos los procesos que dan lugar a nuevos números cromosómicos, las pruebas diagnósticas para detectar tales cambios y las propiedades de las células u organismos portadores de los diferentes tipos de complementos cromosómicos. Como en cualquier área de la Citogenética, las técnicas utilizadas son una combinación de técnicas genéticas y microscópicas. Los cambios en el número de cromosomas se clasifican generalmente en dos tipos, cambios de dotaciones cromosómicas completas y cambios que sólo afectan a partes de una dotación cromosómica. Estudiaremos ambos tipos de cambios en las dos secciones siguientes.

Euploidía anormal

El número de cromosomas que constituye una dotación básica se denomina **número monoploide** (x). Los organismos que contienen múltiplos del número monoploide de cromosomas se denominan **euploides**. Se comentó, en capítulos anteriores, que los eucariotas suelen tener una dotación cromosómica (haploides) o dos (diploides). Haploides y diploides son, pues, casos de euploidía normal. Los euploides que presentan más de dos dotaciones cromosómicas se denominan **poliploides**. De acuerdo con esto, $1x$ es **monoploide**, $2x$ es diploide, y los tipos poliploides son **triploides** ($3x$), **tetraploides** ($4x$), **pentaploides** ($5x$), **hexaploides** ($6x$) y así sucesivamente. Los polipoloides surgen de forma natural como mutaciones cromosómicas espontáneas y, como tales, deben considerarse anomalías, ya que difieren de la norma anterior. Sin embargo, muchas especies de plantas y animales han surgido claramente por poliploidía, por lo que la evolución, evidentemente, se beneficia de la poliploidía cuando surge. Hay que señalar que organismos con una dotación cromosómica a veces surgen como variantes de diploides; esas variantes se llaman **monoploides** ($1x$). En algunas especies, los estados monoploides forman parte del ciclo de vida regular, pero otros monoploides son anomalías espontáneas.

El número haploide (n), que ya hemos utilizado en numerosas ocasiones, se refiere estrictamente al número de cromosomas de los gametos. En la mayoría de los animales, o en muchas plantas con las que estamos familiarizados, el número haploide y el monoploide coinciden. De esta forma, n o x (o $2n$ o $2x$) se utilizan indistintamente. Sin embargo, en ciertas plantas como el trigo actual, n y x son diferentes. El trigo tiene 42 cromosomas, pero un estudio detallado revela que es hexaploide, con seis dotaciones (similares más que idénticas) de siete cromosomas. Por lo tanto, $6x = 42$ y $x = 7$. Sin embargo, los gametos del trigo contienen 21 cromosomas, luego $n = 21$ y $2n = 42$.

Monoploides

Los machos de las abejas, las avispas y las hormigas son monoploides. En el ciclo de vida normal de estos insectos, los machos se desarrollan mediante partenogénesis (es decir, a partir de huevos no fecundados). En la mayoría de las especies, sin embargo, los individuos monoploides son anormales, y aparecen en las poblaciones naturales como aberraciones poco frecuentes. En las células germinales de un monoploide, la meiosis no ocurre de una manera normal debido a que los cromosomas no disponen de homólogos con los que aparear. Por ello, los monoploides son típicamente estériles. (Sin embargo, en algunos animales monoploides, tales como las abejas macho, se evita la meiosis y los gametos se producen básicamente por división mitótica). Si la meiosis tuviera lugar y los cromosomas individuales segregaran al azar, la probabilidad de que todos los cromosomas migraran hacia un mismo polo sería $(\frac{1}{2})^{x-1}$, donde x es el número de cromosomas. Esta fórmula permite estimar la frecuencia de gametos viables (con una dotación cromosómica completa) que, obviamente, será un número muy pequeño si x es grande.

Los monoploides desempeñan un papel importante en las estrategias actuales de mejora genética vegetal. La diploidía es un obstáculo cuando se desean inducir y seleccionar nuevas mutaciones en las plantas, o generar nuevas combinaciones de alelos favorables de diferentes loci. Para que las mutaciones recesivas se expresen tienen que hacerse homocigóticas, ya que las combinaciones favorables de genes en los heterocigotos se eliminan durante la meiosis. Los monoploides permiten soslayar algunos de estos problemas. En algunas plantas, los monoploides pueden obtenerse artificialmente a partir de los productos de la meiosis en las anteras de la planta. Mediante el tratamiento con frío se puede conseguir que una célula destinada a convertirse en grano de polen, crezca y origine un embrioide, una pequeña masa de células en división. El embrioide puede crecerse sobre agar y dar lugar a una plántula monoploide, que se puede entonces plantar y dejar que madure (Fig. 18-1).

Los monoploides tienen diversas aplicaciones. En una de ellas, primero se examinan en busca de rasgos o combinaciones génicas favorables, que pueden aparecer a partir de la heterocigosidad ya presente en el parental o pueden ser inducidas en éste con mutágenos. El monoploide puede entonces someterse a duplicación cromosómica para dar lugar a un diploide completamente homocigótico, que sufre meiosis y es capaz de producir semilla. ¿Cómo se logra la duplicación? Es bastante fácil, mediante aplicación de un compuesto denominado colchicina al tejido meristemático. La **colchicina** —una droga alcaloide extraída del azafrán— inhibe la formación del huso acromático, por lo que tras su tratamiento se producen células con dos dotaciones cromosómicas

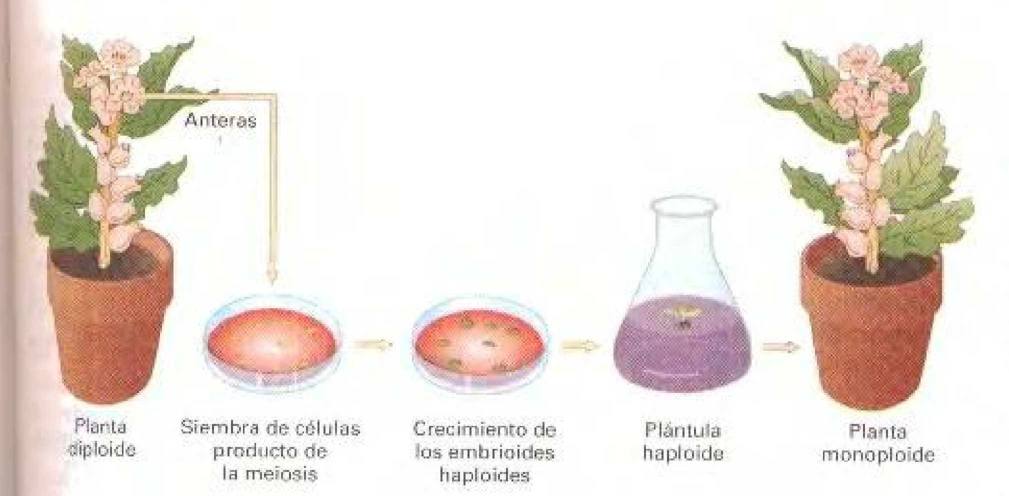


Figura 18-1. Construcción de una planta monoploide mediante cultivo de tejidos. Granos de polen (haploides) tratados adecuadamente se siembran en un medio de agar enriquecido con ciertas hormonas vegetales. En estas condiciones, los embrioides haploides dan lugar a plántulas monoploides. Tras trasplantarlas a otro medio que contiene hormonas vegetales diferentes, estas plántulas se convierten en plantas monoploides maduras con raíces, tallos, hojas y flores.

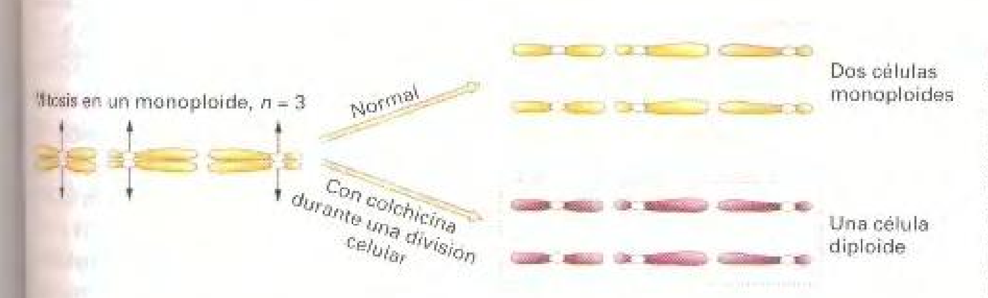


Figura 18-2. Tratamiento con colchicina para producir un diploide a partir de un monoploide. La colchicina, añadida a células mitóticas durante la metafase y la anafase, interrumpe la formación del huso acromático, impidiendo la separación de las cromátidas una vez que el centrómero se ha dividido. Se crea una célula que presenta pares de cromosomas homólogos homocigóticos para todos los loci.

...as (Fig. 18-2). Estas células pueden proliferar y dar lugar a un ...ctor de tejido diploide que se puede identificar citológicamente.

Otra utilidad de los monoploides es que sus células pueden ...tarse en los procesos de mutagénesis y selección como si fue- ...n una población de organismos haploides. Se aíslan las célu- ...la, se eliminan sus paredes por tratamiento enzimático y se tra- ...an con un mutágeno. A continuación, se siembran en un medio ...ectivo (puede ser un compuesto tóxico que produzca normal- ...ente alguno de los parásitos de la planta o un insecticida) para ...leccionar las células resistentes. Finalmente, las plántulas resistentes se desarrollan en plantas haploides, que pueden someterse a tratamiento de duplicación con colchicina para originar una línea pura resistente (Fig. 18-3).

Se trata de técnicas muy eficaces que permiten evitar el proceso normalmente lento de la mejora vegetal meiótica. Estas técnicas se han utilizado con éxito en el caso de varias plantas cultivables importantes, tales como la soja o el tabaco.

La técnica de las anteras para producir monoploides no funciona en todos los organismos o en todos los genotipos de un organismo. Se ha desarrollado otra técnica útil en la cebada, una

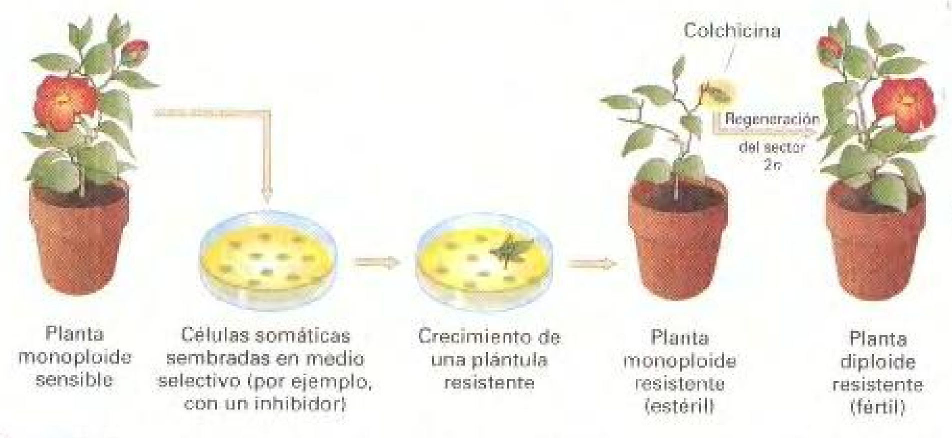


Figura 18-3. Utilización de técnicas microbianas para la mejora genética vegetal. Las paredes celulares de las células haploides se eliminan mediante tratamiento enzimático. A continuación, las células se exponen a un mutágeno y se siembran en placas con medio sólido que contiene un agente selectivo, por ejemplo, un producto tóxico producido por un parásito de la planta. Sólo crecerán aquellas células que contengan una mutación de resistencia que les permita vivir en presencia de la toxina. Tras un tratamiento con las hormonas vegetales adecuadas, las células darán lugar a plantas maduras monoploides. Tras otro tratamiento con colchicina, pueden convertirse en plantas diploides homocigóticas.

planta cultivable importante. Cuando la cebada diploide, *Hordeum vulgare*, se poliniza con la especie relacionada *Hordeum bulbosum*, se produce fecundación. Durante las divisiones celulares somáticas subsiguientes, sin embargo, los cromosomas de *H. bulbosum* se eliminan preferentemente del cigoto, dando lugar a un embrión haploide. (El proceso de haploidización parece estar causado por una incompatibilidad genética entre los cromosomas de especies diferentes). Los cromosomas de los haploides resultantes pueden duplicarse mediante tratamiento con colchicina. Esta estrategia ha permitido la producción rápida y el cultivo generalizado de nuevas variedades de cebada, y también se está utilizando con éxito en otras especies.

COROLARIO

Para crear nuevas estirpes de plantas, los genetistas obtienen monoploides con genotipos favorables que, posteriormente, se someten a duplicación cromosómica para dar lugar a diploides homocigóticos fértiles.

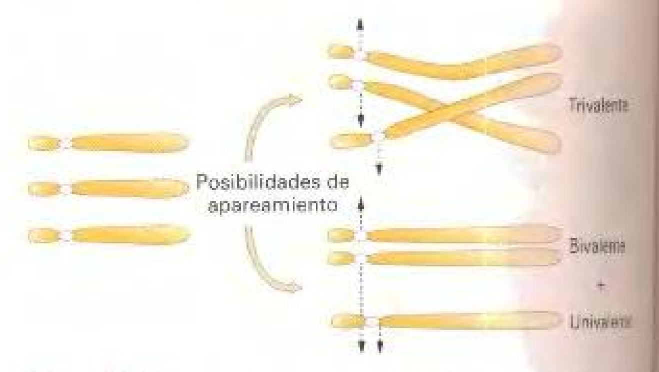


Figura 18-4. Esquema de las dos posibilidades de emparejamiento de los tres cromosomas homólogos de un triploide antes de la primera división meiótica. Observe que el resultado será el mismo en ambos casos: una de las células resultantes recibirá dos cromosomas y la otra sólo uno. Sin embargo, la posibilidad de que esta última célula llegue a convertirse en un gameto haploide funcional es muy baja, porque para que esto ocurriera, además tendría que recibir sólo uno de los tres cromosomas homólogos de toda la dotación. Observe que cada cromosoma es en realidad un par de cromátidas.

Poliploides

En cuanto a los poliploides, debemos distinguir entre los **autopoliploides**, que se componen de mútiples dotaciones de una misma especie, y los **alopoliploides**, que están compuestos por dotaciones procedentes de especies distintas. Los alopoliploides se forman únicamente entre especies muy cercanas; sin embargo, las diferentes dotaciones cromosómicas son **homeólogas** (sólo parcialmente homólogas) —no son completamente homólogas como ocurre en los autopoliploides.

Triploides

Generalmente, los triploides son autopoliploides. Aparecen espontáneamente en la naturaleza o bien son construidos por los genetistas mediante el cruzamiento entre un tetraploide ($4x$) y un diploide ($2x$). Los gametos $2x$ y x se unen, dando lugar a un triploide, $3x$.

Los triploides son típicamente estériles. El problema, como en el caso de los monoploides, está relacionado con el emparejamiento de los cromosomas durante la meiosis. La sinapsis, o emparejamiento verdadero, determina que se establezca una conexión sólo entre dos de los tres cromosomas de cada tipo, pero parte de un cromosoma puede emparejar con su homólogo y, el resto del mismo, con otro, lo que da lugar a una asociación de tres cromosomas. El tipo de emparejamiento cromosómico que aparece en los diploides se denomina **bivalente**. La asociación de tres cromosomas se denomina **trivalente** y un cromosoma no emparejado se conoce como **univalente**. Así, en los triploides, existen dos posibilidades de emparejamiento, trivalente o bivalente más un univalente. Los centrómeros emparejados segregan a polos opuestos de la célula, pero los homólogos no emparejados emigran al azar a uno u otro polo celular. Como se observa en la Figura 18-4, el resultado de ambas posibilidades de emparejamiento es una segregación desigual, con dos cromosomas que migran en una dirección y el otro, en dirección opuesta. Esto ocurre con todos los cromosomas que aparecen en tres dosis.

Si todos los cromosomas individuales emigran hacia el *mismo* polo y, simultáneamente, los otros dos lo hacen hacia el polo opuesto, los gametos formados serán haploides y diploides. La probabilidad de este tipo de meiosis será $(\frac{1}{2})^{x-1}$, y se espera que su proporción sea baja. El resto de posibilidades, darán lugar a gametos con un número de cromosomas intermedio entre el número haploide y el diploide; dichos genomas son **aneuploides** «no euploides». Seguramente, estos gametos aneuploides darán lugar a una descendencia no viable; de hecho, este fenómeno es responsable de la pérdida de fertilidad en los triploides. El problema se debe a que se produce **desequilibrio génico**, un fenómeno que trataremos repetidamente en este capítulo. Para la mayoría de organismos, una dotación cromosómica euploide supone una combinación perfectamente armonizada de genes con proporciones relativas de éstos que parecen determinar la funcionalidad del conjunto. Se toleran múltiplos de esta combinación, porque no dan lugar a cambios en las proporciones relativas de los genes. Sin embargo, la adición de uno o más cromosomas extra es deletérea, ya que altera dichas proporciones. Aunque se puede regular la función de algunos genes para compensar la «dosis» génica extra, el efecto global de este exceso de material genético es demasiado grande como para que pueda ser regulado. El efecto deletéreo puede expresarse en los gametos, siendo éstos no funcionales, o en el cigoto, dando lugar a letalidad, esterilidad o pérdida de viabilidad.

En los triploides, existe la posibilidad de que se formen algunos gametos haploides o diploides, algunos de los cuales pueden agruparse para formar un cigoto euploide, aunque la probabilidad de que ocurra este hecho es muy baja. Considere los plátanos. Los plátanos que se consumen habitualmente, son triploides estériles que poseen tres dotaciones de 11 cromosomas ($3x = 33$). La probabilidad de que ocurra una meiosis en la que todos los cromosomas univalentes migren hacia el mismo polo de la célula es $(\frac{1}{2})^{x-1}$, o $(\frac{1}{2})^{10} = \frac{1}{1024}$. Por lo tanto, los plátanos son estériles. El rasgo más significativo de dicha esterilidad es la carencia de semillas en el fruto que nos comemos. Otro ejemplo de explotación comercial es el cultivo de sandías triploides. Por las mismas razones que los plátanos, no poseen semillas, siendo ésta una característica que favorece su comercialización.

COROLARIO

Algunos tipos de mutaciones cromosómicas son, por sí mismas, aneuploides; otras, producen gametos o cigotos aneuploides. La aneuploidía es casi siempre deletérea, debido al desequilibrio genético —la proporción de genes es diferente a la de un euploide e interfiere con la función normal del genoma.

Autotetraploides

Los **autotetraploides** aparecen de forma natural, por una duplicación espontánea y accidental de un genoma $2x$ para dar otro $4x$, y también pueden ser inducidos artificialmente mediante la utilización de colchicina. Las plantas autotetraploides ofrecen ventajas de interés comercial, debido a que, en las plantas, el mayor número de dotaciones cromosómicas suele ir asociado a un incremento en el tamaño. Los tamaños de las células, de los frutos, de las flores, de los estomas y de otras estructuras pueden ser todos mayores en el poliploide (Fig. 18-5). Aquí vemos otro efecto que ha de ser explicado por el número de genes. Presumiblemente, la cantidad de producto génico (proteína o RNA) es proporcional al número de genes en la célula, y este número es mayor en las células poliploides que en las diploides.

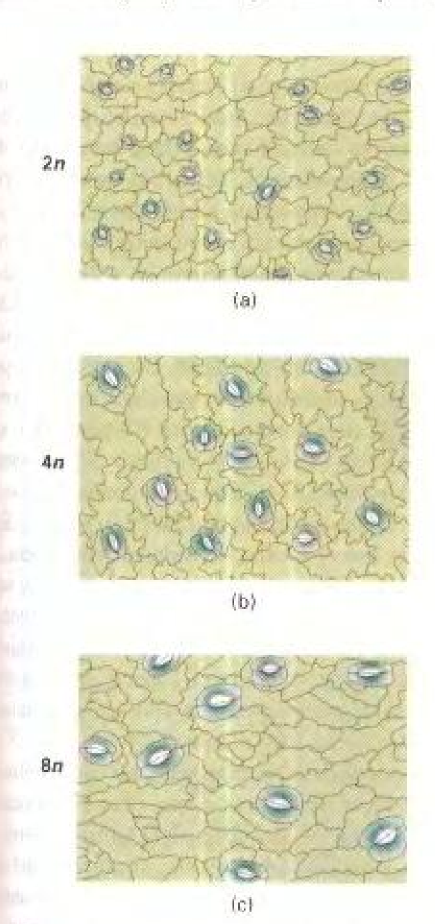


Figura 18-5. Células epidérmicas de plántulas de tabaco que muestran aumento en el tamaño celular, especialmente patente en el tamaño de estomas debido a un aumento de la autopoliploidía. (**a**) Diploide, (**b**) tetraploide y (**c**) octaploide. (De W. Williams, *Genetic Principles and Plant Breeding*, Blackwell Scientific Publications, Ltd.)

COROLARIO

Las plantas poliploides son a menudo de mayor tamaño y tienen órganos mayores que las diploides.

Puesto que 4 es un número par, los autotetraploides pueden presentar meiosis normales, aunque no siempre ocurre así. El factor clave es la forma en la que los cuatro cromosomas de cada dotación se emparejan y segregan durante la meiosis. Existen varias posibilidades, como se muestra en la Figura 18-6. Los emparejamientos entre cuatro cromosomas se denominan **cuadrivalentes**. En los tetraploides, las formas dos-bivalente y cuadrivalente muestran un comportamiento más regular durante la segregación, aunque incluso en este caso, no hay garantía de que la segregación sea 2:2. Si se consigue una segregación 2:2 de todas las dotaciones cromosómicas, como ocurre en algunas especies, los gametos serán funcionales y en tales tetraploides puede desarrollarse un análisis genético formal.

Consideremos la genética de un tetraploide fértil. Podemos imaginar un experimento en el que se utiliza colchicina para duplicar los cromosomas de una planta *A/a* y producir un autotetraploide *A/A/a/a*, que asumiremos da una segregación 2:2. Ahora nos encontramos con un problema adicional debido a que los poliploides, tales como los tetraploides, producen distintas proporciones de segregación entre su descendencia, dependiendo de si el locus en cuestión está o no estrechamente ligado al centrómero. En primer lugar, vamos a considerar un gen centromérico. Los tres patrones posibles de apareamiento y segregación se muestran en la Figura 18-7; éstos ocurren aleatoriamente y con la misma frecuencia. Como indica la figura, los gametos $2x$ son *A/a*, *A/A* o *a/a*, producidos en la proporción 8:2:2, ó 4:1:1. Si una planta así se autofecunda, la probabilidad de obtener un genotipo *a/a/a/a* entre la descendencia es, obviamente, $\frac{1}{6} \times \frac{1}{6} = \frac{1}{36}$. En otras

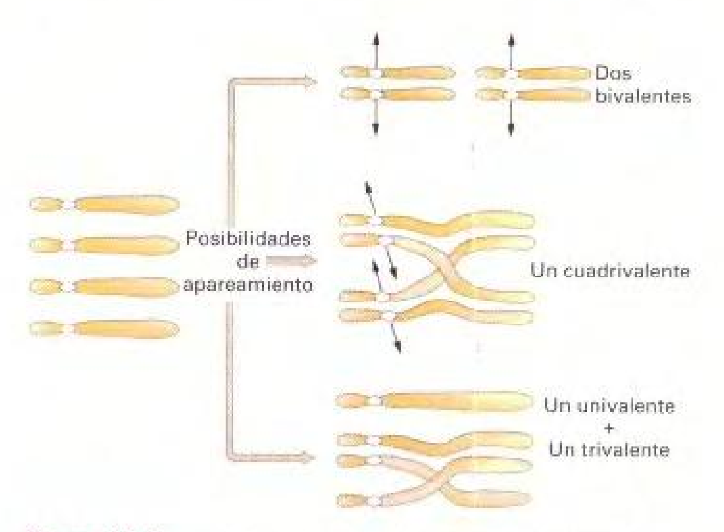


Figura 18-6. Posibilidades de apareamiento cromosómico durante la meiosis de un tetraploide. (Cada cromosoma, en realidad, está formado por dos cromátidas). Los cuatro cromosomas de un mismo tipo pueden aparear como dos bivalentes o como un cuadrivalente. En ambos casos, los gametos son funcionales. Sin embargo, los cuatro cromosomas pueden aparear también en una combinación un univalente-trivalente, que produce gametos no funcionales. Un determinado tetraploide puede mostrar uno o más de estos apareamientos.

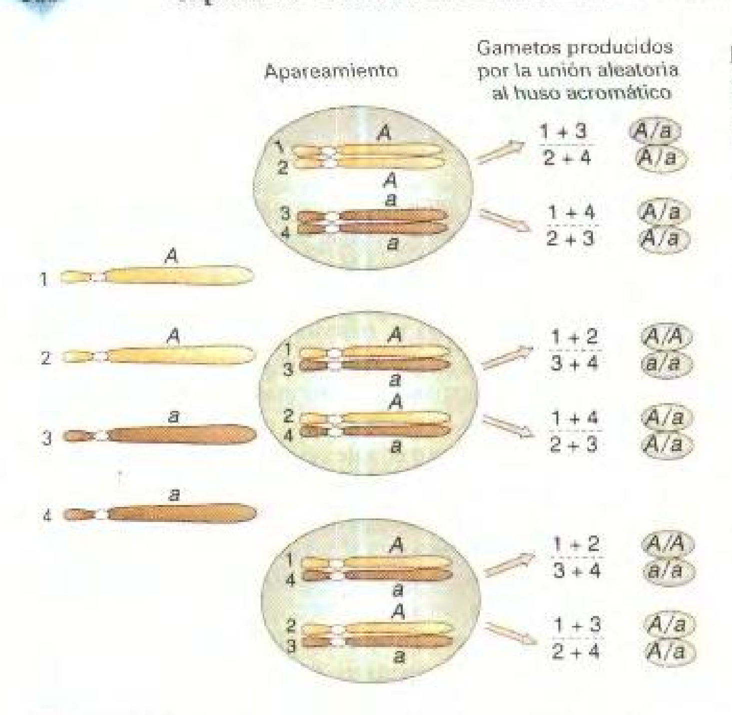


Figura 18-7. Consecuencias genéticas del apareamiento en forma de bivalentes en un tetraploide. (Cada cromosoma, en realidad, está formado por dos cromátidas). Se supone que el locus está situado cerca del centrómero. La autofecundación podría producir varios genotipos incluyendo el *a/a/a/a*.

palabras, se observará una proporción fenotípica 35:1 de *A/–/–/–* : *a/a/a/a* si *A* es dominante sobre tres alelos *a*.

Si, en el mismo tipo de planta, un locus genético *B/b* se encuentra muy alejado del centrómero, debemos tener en cuenta la recombinación. Esto nos obliga a pensar en términos de cromátidas en vez de en cromosomas; hay cuatro cromátidas *B* y cuatro *b* (Fig. 18-8). Dado que el número de entrecruzamientos en una región tan grande será elevado, los genes acabarán separados de sus centrómeros originales. La incorporación simultánea de dos alelos en los gametos es comparable a la extracción de dos bolas al azar de una bolsa que contenga ocho: cuatro de un tipo y cuatro de otro. La probabilidad de incorporar dos alelos *b* es

$$\tfrac{4}{8} \text{ (la primera)} \times \tfrac{3}{7} \text{ (la segunda)} = \tfrac{12}{56} = \tfrac{3}{14}$$

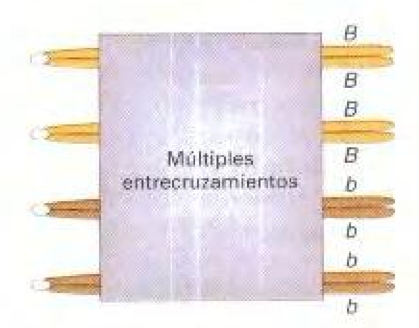
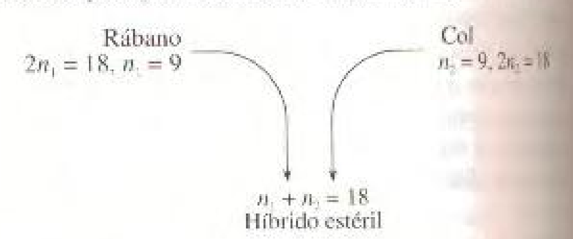


Figura 18-8. Representación muy esquemática de la meiosis en un tetraploide que tiene un locus heterocigótico situado lejos del centrómero. El efecto neto de la existencia de múltiples entrecruzamientos en una región tan extensa será la ausencia de ligamiento entre los genes y sus centrómeros originales. Los genes se incorporan de dos en dos en los gametos, del mismo modo que se pueden extraer dos bolas de una bolsa que contenga ocho bolas: cuatro de un tipo y cuatro de otro.

De este modo, tras la autofecundación, la probabilidad de obtener un genotipo *b/b/b/b* es $\frac{3}{14} \times \frac{3}{14} = \frac{9}{196}$, lo que equivale a aproximadamente $\frac{1}{22}$. Por ello, habrá una proporción fenotípica 21:1 de B/—/—/— : b/b/b/b. Por supuesto, para loci genéticos situados en posiciones intermedias, se obtendrán proporciones intermedias.

Alopoliploides

El **alopoliploide** «clásico» fue construido por G. Karpechenko en 1928. Pretendía construir un híbrido fértil que tuviese las hojas de la col (*Brassica*) y las raíces del rábano (*Raphanus*). Cada una de estas dos especies tiene 18 cromosomas y están suficientemente relacionadas para permitir la fecundación cruzada. Obtuvo un individuo híbrido viable a partir de una semilla. Sin embargo, este híbrido era funcionalmente estéril porque los nueve cromosomas de la col eran demasiado distintos de los cromosomas del rábano para que se produjeran sinapsis y disyunción normales.



Sin embargo, este híbrido (casi) estéril produjo unas cuantas semillas. Cuando se plantaron, estas semillas produjeron individuos fértiles con 36 cromosomas. Todos estos individuos eran alopoliploides. Aparentemente, se habían producido por duplicación cromosómica espontánea accidental a $2n_1 + 2n_2$ en el híbrido estéril, presumiblemente en un tejido que se convirtió en germinal y sufrió meiosis. En el tejido $2n_1 + 2n_2$ hay un homólogo para cada cromosoma y se producen gametos equilibrados de tipo $n_1 + n_2$. Éstos se unen para dar lugar a descendencia alopoliploide $2n_1 + 2n_2$, que es también fértil. Este tipo de alopoliploide se denomina a veces **anfidiploide**, que significa «diploide duplicado» (Fig. 18-9). (Por desgracia para Karpechenko, su anfidiploide tenía las raíces de la col y las hojas del rábano).

Cuando el alopoliploide se cruzó con cualquiera de las especies parentales, la descendencia resultante fue estéril. En el caso del cruzamiento con el rábano, esta descendencia era $2n_1 + n_2$, constituida por un gameto $n_1 + n_2$ del alopoliploide y un gameto n_1 del rábano. Obviamente, los cromosomas n_2 no tenían pareja con que aparear y, por ello, eran estériles. Por consiguiente, Karpechenko había conseguido crear un especie nueva, con ninguna posibilidad de intercambio genético con sus parentales. Llamó *Raphanobrassica* a esta nueva especie.

Hoy en día se desarrollan rutinariamente alopoliploides en la agricultura. En lugar de esperar a que ocurra espontáneamente una duplicación de los cromosomas en el híbrido estéril, se añade colchicina para inducirla. Obviamente, el objetivo del agricultor es combinar algunas de las características útiles de ambas especies parentales en un solo tipo. Los resultados de estos métodos son muy impredecibles, como observó Karpechenko. De hecho, hasta la fecha sólo se utiliza comúnmente un anfidiploide. Se trata del *Triticale*, un anfidiploide entre el trigo (*Triticum*, $2n = 6x = 42$) y el centeno (*Secale*, $2n = 2x = 14$). El *Triticale* com-

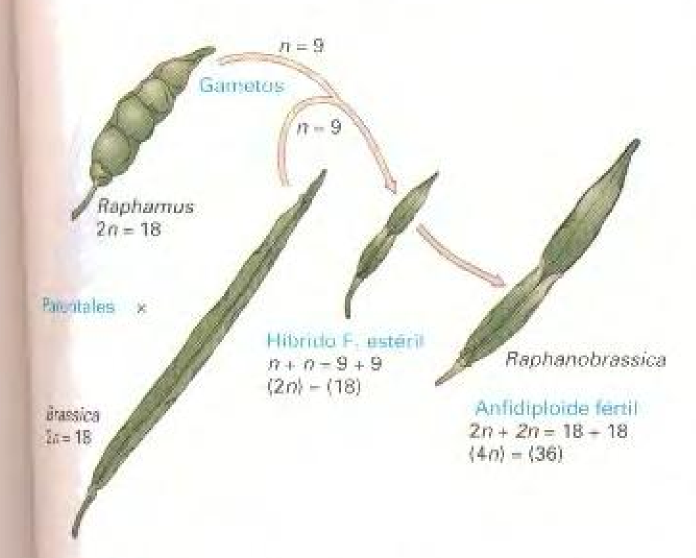


Figura 18-9. Origen del anfidiploide (*Raphanobrassica*) formado a partir de la col (*Brassica*) y el rábano (*Raphanus*). En este caso, el anfidiploide fértil apareció como consecuencia de una duplicación espontánea en el híbrido estéril $2n = 18$. También puede utilizarse colchicina para inducir la duplicación (De A. M. Srb, R. D. Owen y R. S. Edgar, *General Genetics*, 2.ª ed. Copyright © 1965 por W. H. Freeman and Company. Según G. Karpechenko, *Z. Indukt. Abst. Vererb.* 48. 1928. 27.)

na la alta productividad del trigo con la robustez del centeno. La Figura 18-10, muestra el procedimiento para construir el *Triticale*.

En la naturaleza, la alopoliploidía parece desempeñar un papel importante en la especiación de las plantas. Hay varios ejemplos diferentes. Uno particularmente satisfactorio está representado por el género *Brassica*, tal y como se ilustra en la Figura 18-11. En este caso, se han hibridado tres especies parentales diferentes en todas las combinaciones posibles para dar lugar a especies anfidiploides nuevas.

Un alopoliploide natural, particularmente interesante, es el trigo del pan, *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$). Mediante el estudio de varias especies silvestres relacionadas, los genetistas han podido reconstruir la historia evolutiva probable del trigo del pan (Fig. 18-12). En la meiosis del trigo siempre hay 21 pares de cromosomas. Además, se ha podido establecer que cualquier tipo de cromosoma dado tiene un solo cromosoma homólogo específico con el que aparea (apareamiento homólogo) y no cinco potenciales (apareamiento homeólogo). El apareamiento homeólogo, que conduciría a una estabilidad de la especie mucho menor, se suprime por la acción del gen *Ph*, situado en el brazo largo del cromosoma 5 de la serie B. De este modo, *Ph* asegura una genética típica de un diploide para esta especie básicamente hexaploide. Sin *Ph*, el trigo del pan probablemente no habría aparecido nunca. Es interesante especular sobre si la civi-

Semilla híbrida de la primera generación (estéril)
Brote
Tratamiento con colchicina
Duplicación de cromosomas
Planta madura
Semillas de la segunda generación (fértiles)
Polen de centeno
Trigo
Escisión del embrión de la semilla híbrida
Cultivo en agar (en oscuridad)
Crecimiento de raíces (con luz)
Tratamiento con colchicina
Duplicación de cromosomas
Planta madura
Semillas de la segunda generación (fértiles)

Figura 18-10. Técnicas para construir el anfidiploide *Triticale*. Si la semilla híbrida no germina, se puede utilizar el cultivo de tejidos (*parte inferior*) para obtener una planta híbrida. (De Joseph H. Hulse y David Spurgeon, «Triticale». Copyright © 1974 de *Scientific American*, Inc. Todos los derechos reservados.)



Figura 18-11. Triángulo de especies que muestra la importancia de la anfidiploidía en la producción de nuevas especies de *Brassica*.

lización occidental podría haberse originado o progresar sin esta especie, en otras palabras, sin el gen *Ph*.

Alopoliploides somáticos por hibridación celular

Otra estrategia innovadora en el área de la mejora vegetal es intentar construir híbridos de tipo alopoliploide por métodos de fusión celular asexual. Teóricamente, esta técnica permitiría combinar especies parentales muy diferentes. La técnica funciona en la práctica, pero los únicos alopoliploides que se han conseguido hasta el momento podrían haberse construido también por los métodos sexuales que ya hemos visto. En el método de fusión celular, se preparan suspensiones celulares de las dos especies parentales y se eliminan sus paredes mediante tratamientos enzimáticos especiales. Las células desprovistas de pared se denominan **protoplastos**. Las dos suspensiones de protoplastos se ponen en contacto en presencia de polietilenglicol, que estimula su fusión. Las células parentales y las fusionadas proliferan sobre medio con agar, dando lugar a colonias (de forma muy parecida a como lo hacen los microorganismos). Si se examinan estas colonias, o *callos*, se observa que un porcentaje considerable de ellas son híbridos de tipo alopoliploide con un número de cromosomas igual a la suma de los cromosomas de los parentales. Esto indica que no sólo se fusionan las membranas celulares de los protoplastos, sino también las nucleares dando lugar a un anfidiploide $2n_1 + 2n_2$.

Un buen ejemplo de híbrido de este tipo es el tabaco comercial, *Nicotiana tabacum*, que tiene 48 cromosomas. Esta especie se encontró originalmente en la naturaleza en forma de anfidiploide espontáneo. Los parentales probablemente son *N. sylvestris* y *N. tomentosiformis*, cada uno con 24 cromosomas. Un cruzamiento sexual entre *N. tabacum* y cualquiera de estos parentales probables, daría un híbrido con 36 cromosomas portador de 12 pares de cromosomas y 12 cromosomas sin pareja. Un cruzamiento entre *N. sylvestris* y *N. tomentosiformis* daría un híbrido con 24 cromosomas en el que no habría apareamiento. Parece, por tanto, que una parte del genoma de *N. tabacum* procede de *N. sylvestris* y otra parte de *N. tomentosiformis*. Este anfidiploide se puede volver a construir sexualmente, mediante los procesos previamente descritos que utilizan colchicina, o somáticamente por fusión celular. Cuando se fusionan células de los probables parentales, se produce una línea celular híbrida con 48 cromosomas a partir de la que pueden crecer plantas con un comportamiento idéntico al de *N. tabacum*. (Advierta que en este segundo método no se requiere colchicina, pues el producto de la fusión es ya anfidiploide.)

La obtención de híbridos somáticos se puede incrementar cuando se dispone de un sistema selectivo. En *N. tabacum* por ejemplo, se fusionaron dos líneas monoploides para formar un cultivo híbrido diploide, y se utilizó la técnica de la complementación como sistema selectivo. La primera línea presentaba hojas blanquecinas fotosensibles, debido a la presencia de una mutación recesiva *w*. La otra línea presenta hojas amarillentas, también fotosensibles, debido a una mutación recesiva y situada en un locus diferente. Cuando se combinaron las células en una placa de Petri, pudieron seleccionarse callos $w^+/w \cdot y^+/y$ por su resistencia a la luz y su color rojo normal. A partir de ellos seleccionaron plántulas que se injertaron en plantas maduras o se trasplantaron a maceta. El protocolo para llevar a cabo este experimento se ilustra en la Figura 18-13.

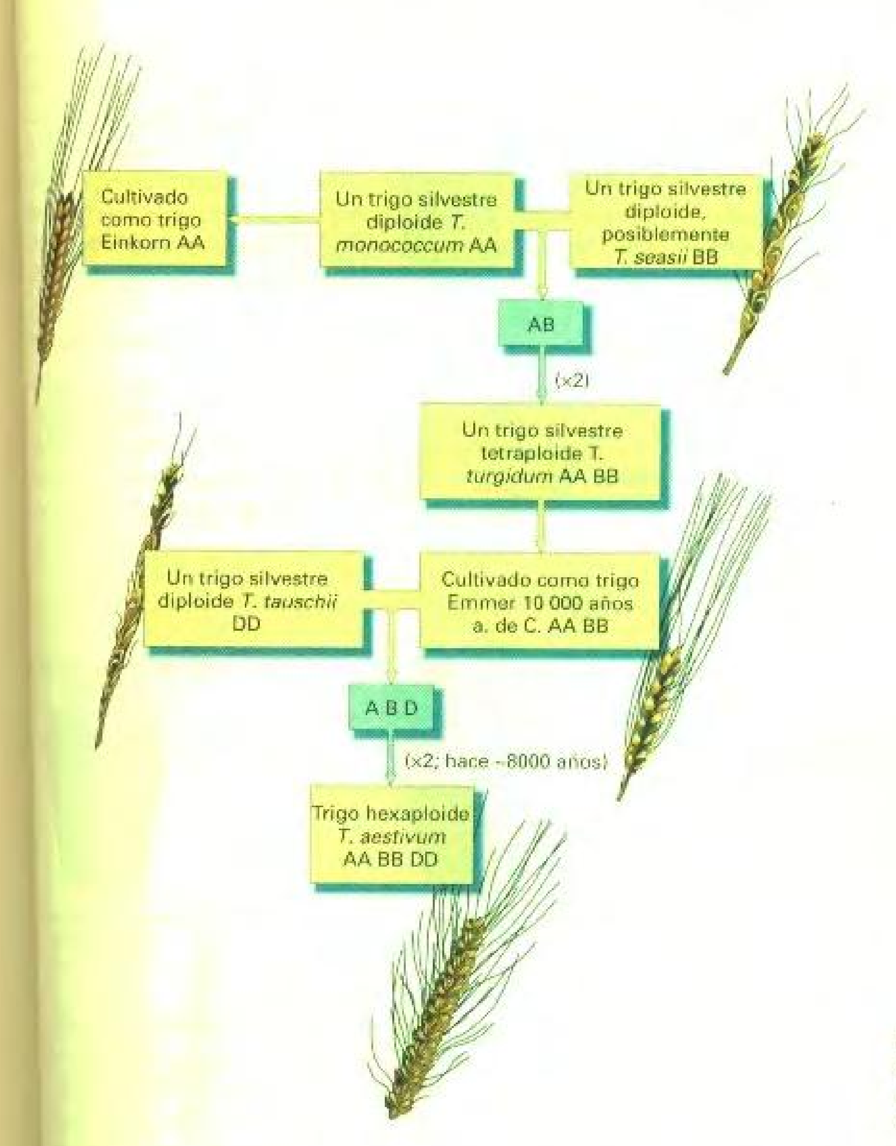


Figura 18-12. Diagrama del origen propuesto para el trigo hexaploide actual, que implica la producción de anfidiploides en dos momentos distintos. A, B y D son dotaciones cromosómicas diferentes.

En la Figura 18-14 se comparan dos alotetraploides de *Petunia*, uno producido por hibridación sexual y otro producido por hibridación somática. La figura demuestra que ambos presentan idéntico aspecto y producen los mismos tipos de descendientes.

COROLARIO

Los alopoliploides se construyen cruzando especies relacionadas y duplicando los cromosomas del híbrido, o por fusión asexual de células de especies distintas.

Poliploidía en los animales

Se habrá observado que la mayor parte de los ejemplos de poliploidía que hemos citado corresponden a plantas, ya que es un fenómeno más común en ellas que en los animales. No obstante, hay muchos casos de animales poliploides. Se encuentran ejemplos en planarias, sanguijuelas y camarones de mar. En estos casos, la reproducción ocurre por partenogénesis, es decir, por el desarrollo de un embrión a partir de un tipo especial de huevo no fertilizado, sin necesidad de que ocurra la fecundación. Sin embargo, la poliploidía no se restringe a estas llamadas formas inferiores; los anfibios y reptiles poliploides son extrañamente frecuentes. Éstos presentan varias formas de reproducción. En los sapos y ranas poliploides, machos y hembras participan en los ciclos sexuales, mientras que las salamandras y los lagartos poliploides son partenogenéticos.

Algunos peces son también poliploides y, en dos casos, parece que un único hecho de poliploidía ha dado lugar a una familia taxonómica completa durante la evolución. Esta situación contrasta con la de los anfibios y reptiles, ya que en estos casos, todos los poliploides cuentan con especies diploides evolutivamente muy cercanas y, por tanto, los hechos de poliploidía no parecen haber sido muy importantes en la evolución del grupo. En el caso de los peces, la familia de los salmónidos (que incluye al salmón y a la trucha) es un ejemplo de grupo que parece haberse originado por poliploidía. Los salmónidos contienen una cantidad de DNA dos veces mayor que la de otras especies cercanas de peces. Las distintas especies de salmónidos contienen diferentes números cromosómicos, pero se ha descubierto

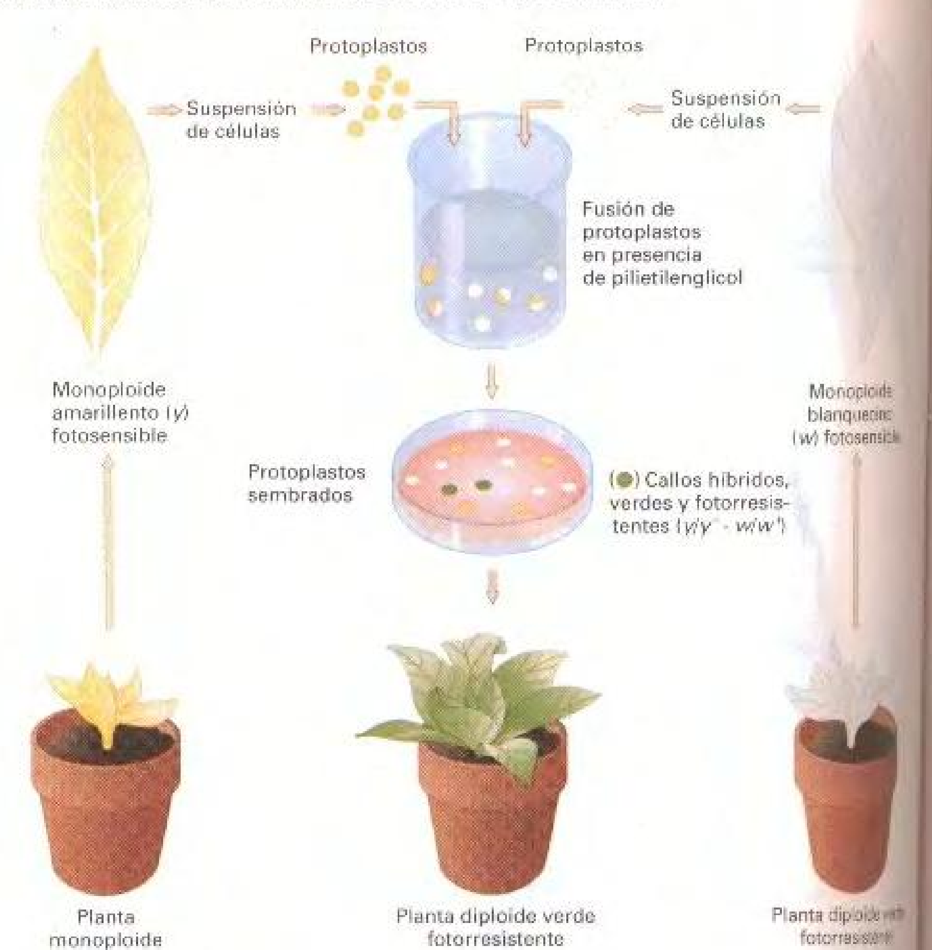


Figura 18-13. Construcción de un híbrido a partir de dos líneas monoploides de *Nicotiana tabacum* por fusión celular. Una de las estirpes tiene hojas amarillentas fotosensibles y la otra hojas blanquecinas fotosensibles. Se producen protoplastos por eliminación enzimática de la pared celular de células procedentes de las hojas de cada estirpe. Como se ha indicado, los protoplastos pueden fusionarse; aquellos que se fusionan dando híbridos pueden formar callos que son fotorresistentes como consecuencia de la recesividad de los genotipos parentales. Los callos, cuando se someten a un régimen hormonal adecuado, pueden dar lugar a plantas diploides verdes.

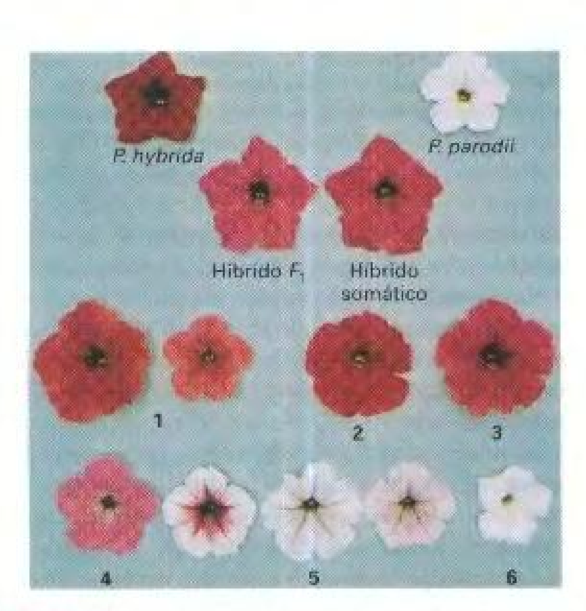


Figura 18-14. En *Petunia*, la hibridación sexual y la hibridación somática producen alotetraploides idénticos. En la parte superior se muestran las dos líneas parentales: *P. hybrida*, de color rojo, y *P. parodii*, de color blanco. El alotetraploide de la F_1 mostrado en la fila central se obtuvo mediante cruzamiento de los dos parentales diploides y duplicación del número de cromosomas del híbrido; el alotetraploide mostrado al lado del anterior se obtuvo mediante fusión de células somáticas de las dos líneas parentales. Ambos tetraploides producen el mismo tipo de descendencia, mostrada debajo. Los números indican plantas que se utilizaron en experimentos posteriores. (J. B. Power.)

que el grupo presenta un número casi invariable de brazos cromosómicos (algunos fusionados en algunas especies), que es dos veces el número de brazos de otros grupos evolutivamente cercanos. Por tanto, las pruebas apuntan a que los salmónidos han evolucionado a partir de un único hecho de duplicación que dio lugar a un tetraploide.

La esterilidad de los animales triploides, como sucede con las plantas, se ha explotado comercialmente. Se han desarrollado ostras triploides que presentan ventajas comerciales en relación con sus parientes diploides. Las ostras diploides tienen una época de desove en la que presentan un sabor desagradable, mientras que las triploides, por su esterilidad, no desovan y son sabrosas durante todo el año.

En el caso de la especie humana, aparecen cigotos poliploides como consecuencia de errores durante la división celular, aunque la mayoría de ellos mueren en el útero. Ocasionalmente nacen niños triploides, pero ninguno sobrevive.

Aneuploidía

La aneuploidía representa la segunda categoría de mutaciones donde el número cromosómico es anormal. Un **aneuploide** es un organismo cuyo número de cromosomas difiere del silvestre. Generalmente, la dotación cromosómica del aneuploide difiere de la del silvestre en sólo uno o un número pequeño de cromosomas. Los aneuploides pueden tener un número de cromosomas

mayor o menor que el silvestre. La denominación de los aneuploides se basa en el número de copias del cromosoma específico en el estado de aneuploide. Por ejemplo, el estado aneuploide $2n - 1$ se denomina **monosómico** («un cromosoma»), porque sólo está presente una copia de un cromosoma concreto, en lugar de las dos que aparecen en su progenitor diploide. El aneuploide $2n + 1$, se denomina **trisómico**, $2n - 2$ es **nulisómico** y $n + 1$ es **disómico**.

Nulisómicos ($2n - 2$)

Aunque la nulisomía es una condición letal en los diploides, un organismo como el trigo (que se comporta meióticamente como un diploide, pero es un hexaploide) puede tolerarla. Aparentemente, los cuatro cromosomas homeólogos compensan la pérdida del par de homólogos. De hecho, se han obtenido cada uno de los 21 posibles nulisómicos del trigo; ilustrados en la Figura 18-15. Su aspecto difiere del hexaploide normal; además, la mayoría de los nulisómicos presentan un crecimiento menos vigoroso.

Monosómicos ($2n - 1$)

Generalmente, los complementos cromosómicos monosómicos son perjudiciales por dos razones básicas. En primer lugar, porque los cromosomas que faltan alteran gravemente el equilibrio génico de la dotación cromosómica. (Vimos este efecto anteriormente). En segundo lugar, porque la ausencia de un cromosoma tiene como consecuencia que cualquier alelo recesivo perjudicial situado en el cromosoma sin pareja se convierta en hemicigótico y, por lo tanto, se exprese directamente a nivel fenotípico. Observe que se producen los mismos efectos que en el caso de las deleciones.

Un fenómeno de **no disyunción** durante la mitosis o la meiosis es el origen de muchos aneuploides. La disyunción es la separación normal de los cromosomas o cromátidas hacia los polos opuestos de la célula durante la división nuclear. La no disyunción es un fallo de este proceso y finaliza con dos cromosomas (o cromátidas) emigrando hacia un mismo polo, mientras que hacia el otro no migra ninguno. La no disyunción ocurre espontáneamente, y constituye otro ejemplo más de fallo aleatorio de un proceso celular básico.

En una no disyunción meiótica, el fallo en la separación de los cromosomas puede tener lugar en la primera o en la segunda división (Fig. 18-16). En cualquier caso, se producen gametos $n + 1$ y $n - 1$. Si un gameto $n - 1$ es fecundado por un gameto n, se produce un cigoto monosómico ($2n - 1$). La fusión entre un gameto $n + 1$ y uno n, produce un trisómico $2n + 1$.

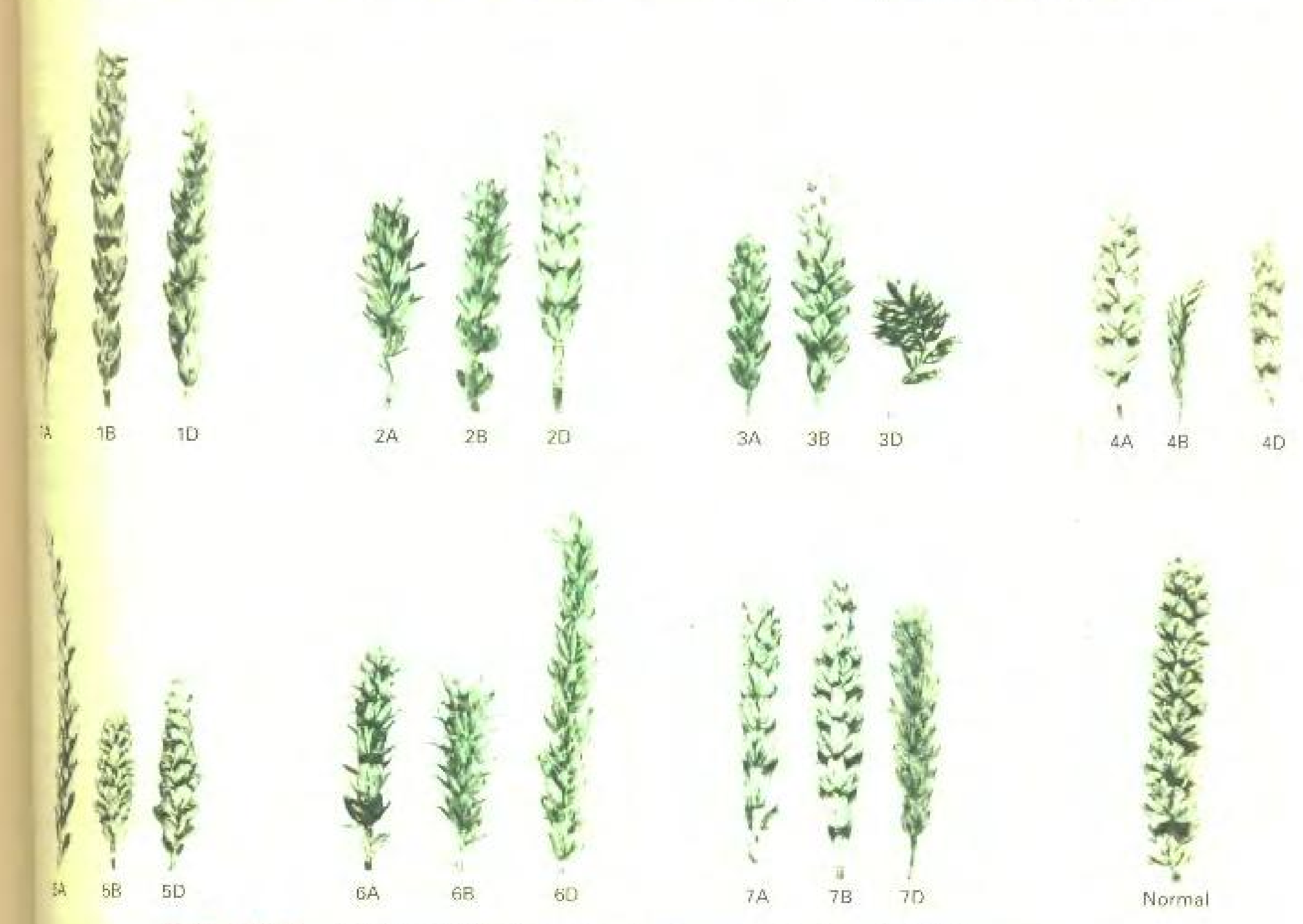


Figura 18-15. Nulisómicos del trigo. Aunque los nulisómicos suelen ser letales para los diploides normales, en algunos organismos como el trigo, que aparentemente es diploide pero en el fondo es hexaploide, puede tolerarse la nulisomía. Los nulisómicos, no obstante, crecen menos vigorosos. (Cortesía de E. R. Sears.)

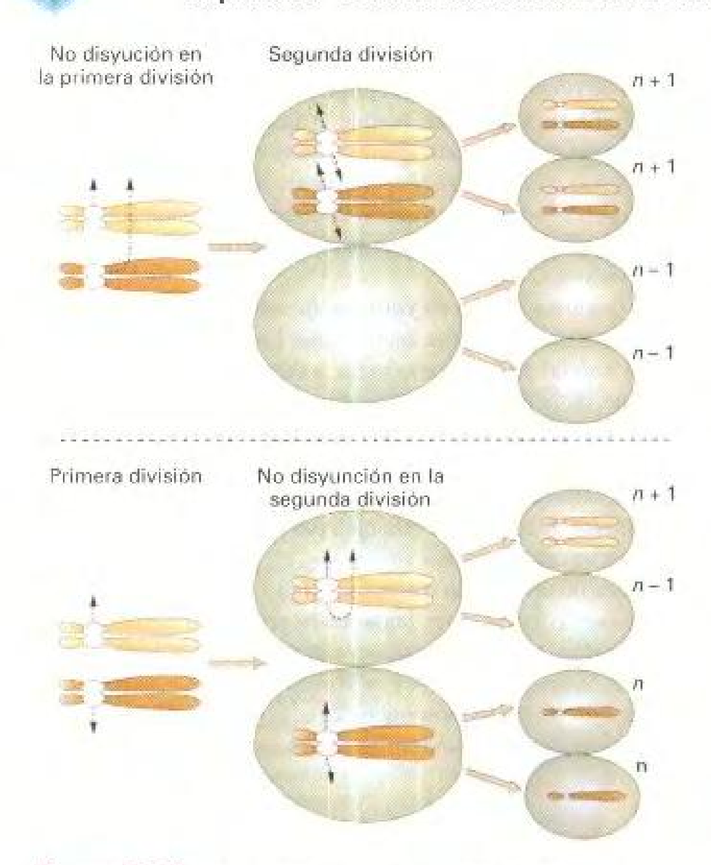


Figura 18-16. Producción de gametos aneuploides por falta de disyunción en la primera o en la segunda división meiótica.

Se desconocen los procesos moleculares precisos que fallan en la no disyunción; aunque, en sistemas experimentales, la frecuencia de no disyunción puede incrementarse interfiriendo la acción de los microtúbulos. Parece que la no disyunción es más probable durante la meiosis I. Este hecho no debe sorprender, ya que la disyunción normal durante la anafase I requiere que se mantenga el emparejamiento adecuado de los cromosomas homólogos durante la profase I y la metafase I. Por el contrario, la correcta disyunción durante la anafase II o durante la mitosis depende sólo de que el centrómero de cada cromosoma se divida de forma adecuada, no requiriendo un proceso tan elaborado durante la profase y la metafase.

Una no disyunción durante la meiosis I puede ser vista como un fallo en la formación o el mantenimiento de una tétrada (grupo de cuatro cromátidas) hasta la anafase I. Normalmente, los entrecruzamientos están implicados en este proceso. En muchos organismos, el número de entrecruzamientos es suficiente para asegurar que todas las tétradas tendrán, por lo menos, un intercambio por meiosis. En *Drosophila*, muchos de los cromosomas debidos a no disyunción en los gametos disómicos recién generados son no recombinantes, llevando uno de los cromosomas implicados en la no disyunción los marcadores de uno de los cromosomas parentales y, su homólogo, los marcadores del otro cromosoma parental. Se han realizado observaciones similares en las trisomías humanas. Además, en distintos animales de experimentación, las mutaciones que interfieren con la recombinación provocan un incremento masivo en la frecuencia de no disyunción durante la meiosis I. Este efecto indica una función importante del entrecruzamiento en el mantenimiento de la asociación de los cromosomas en la tétrada; en ausencia de esas asociaciones, los cromosomas se hacen vulnerables a la no disyunción durante la anafase I.

En la especie humana, la monosomía para los cromosomas sexuales (44 autosomas + 1 X) produce un fenotipo conocido como *síndrome de Turner*. Los afectados por el síndrome presentan un fenotipo característico, fácilmente reconocible: son mujeres estériles, de estatura baja, que suelen tener un repliegue membranoso entre el cuello y los hombros (Fig. 18-17). Su inteligencia se acerca a la normal, aunque están afectadas en algunas funciones cognoscitivas particulares. Su frecuencia es alrededor de 1 por cada 5000 mujeres. Los monosómicos para cualquier autosoma mueren en el útero.

Los genetistas han utilizado plantas nulisómicas y monosómicas viables para identificar los cromosomas en los que aparecen los loci de nuevos alelos mutantes recesivos. Por ejemplo, un genetista puede obtener diferentes líneas monosómicas, cada una de las cuales carece de un cromosoma diferente. Los individuos homocigóticos para el nuevo alelo se cruzan con cada una de las líneas cromosómicas, y la descendencia de cada cruzamiento se examina en relación con la expresión del fenotipo recesivo. El fenotipo aparece en algunos de los descendientes del parental monosómico para el cromosoma portador del locus, que queda identificado de esta forma. La Figura 18-18 muestra que esta prueba funciona gracias a que la meiosis del parental monosómico produce algunos gametos que carecen del cromosoma portador del locus. Cuando uno de estos gametos forma un cigoto, el cromosoma que aporta el parental homocigótico recesivo determina el fenotipo.



Figura 18-17. Características del síndrome de Turner, debido a la posesión de un único cromosoma X (XO). (Adaptado de F. Vogel y A. G. Motulsky, *Human Genetics*, Springer-Verlag, 1982.)

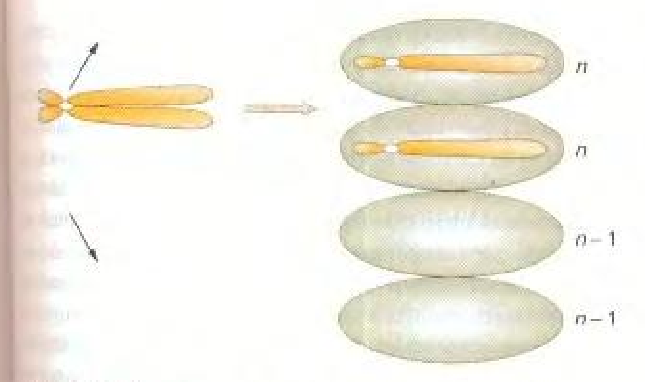


Figura 18-18. Comportamiento de un cromosoma monosómico durante la meiosis. Dos de los gametos resultantes contienen una dotación cromosómica haploide normal (n); los otros dos contienen una dotación a la que falta el cromosoma monosómico del parental ($n-1$).

El análisis genético en la especie humana revela ocasionalmente un efecto similar de desenmascaramiento de un fenotipo recesivo producido por un gameto $n-1$. Por ejemplo, dos personas cuya visión es normal, pueden tener una hija que presenta el *síndrome de Turner* y, además, es ciega para los colores rojo-verde. Este hecho se interpreta de la siguiente manera. En primer lugar, dado que el padre no presenta ceguera para los colores, la madre debe ser heterocigótica para el alelo recesivo y la hija debe haber heredado dicho alelo. Además, debe haber ocurrido un fenómeno de no disyunción en el padre, dando lugar a un espermatozoide $n-1$ que se ha combinado con un óvulo portador del alelo de la ceguera para los colores de la madre.

COROLARIO

Los monosómicos muestran los efectos deletéreos del desequilibrio génico, así como la expresión inesperada de alelos recesivos que están presentes en el cromosoma monosómico.

Trisómicos ($2n + 1$)

La trisomía también produce un desequilibrio cromosómico y puede dar lugar a alguna anormalidad o a la muerte. Sin embargo, se encuentran muchos casos de individuos trisómicos viables. Podrá recordar que estudiamos los trisómicos de *Datura stramonium* en el Capítulo 3 (ver Fig. 3-7). Además, los trisómicos pueden ser fértiles. Cuando se observan al microscopio las células de algunos organismos trisómicos durante el emparejamiento de los cromosomas en la meiosis, se aprecia que los cromosomas trisómicos forman un trivalente (un grupo de tres cromosomas emparejados), mientras que los otros cromosomas forman bivalentes normales. ¿Qué proporciones genotípicas esperaríamos para los genes del cromosoma trisómico? Consideremos un gen A que está situado cerca del centrómero de ese cromosoma y asumamos que el genotipo del individuo es $A/a/a$. Si suponemos, además, que dos de los centrómeros migran hacia polos opuestos de la célula, como en un bivalente normal, y que el otro cromosoma migra al azar hacia cualquiera de los polos, podemos predecir las tres posibles formas de segregación, igualmente frecuentes, que se ilustran en la Figura 18-19. Estas segregaciones producen una proporción gamética global de $1A{:}2A/a{:}2a{:}1a/a$. Esta proporción y la correspondiente al genotipo trisómico $A/A/a$ se observan en la práctica. Si se dispone de un conjunto de todos los posibles trisómicos (como el que se ha estudiado en el caso de los nulisómicos), se puede proceder a la asignación de una nueva mutación a un cromosoma concreto, determinando cuál de los trisómicos de la colección produce este tipo de segregación especial.

En los seres humanos, se conocen varios ejemplos de trisómicos viables. La combinación XXY (1 de cada 1000 nacimien-

	Un polo	Otro polo
1 A 2 a 3 a	1 A, 2 a	3 a
	1 A, 3 a	2 a
	2 a, 3 a	1 A

Figura 18-19. Genotipos de los productos meióticos de un trisómico $A/a/a$. Se pueden producir tres patrones de segregación con igual frecuencia.

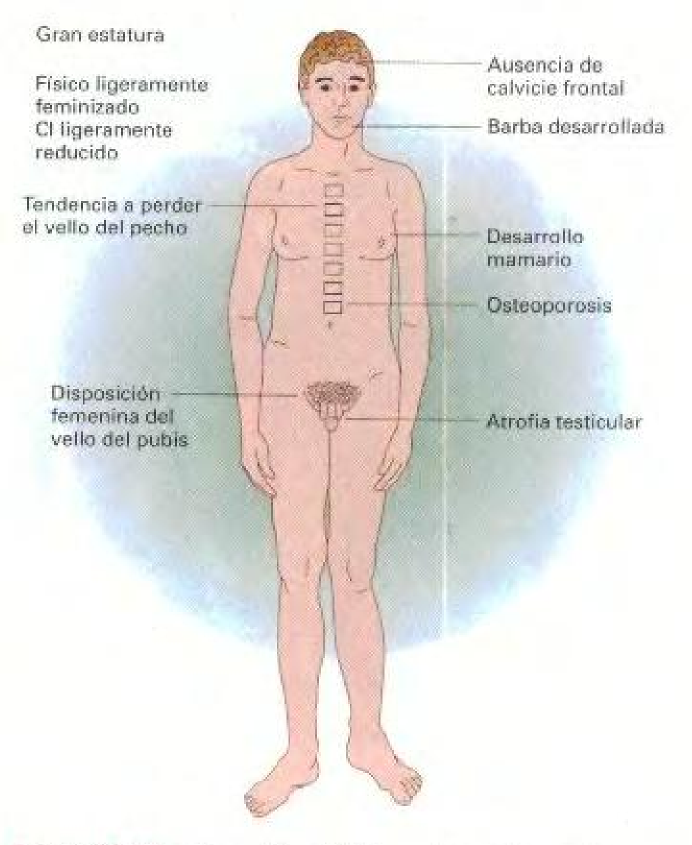


Figura 18-20. Características del síndrome de Klinefelter (XXY). (Adaptado de F. Vogel y A. G. Motulsky, *Human Genetics*, Springer-Verlag, 1982.)





Figura 18-21. Características del síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21). (a) Representación esquemática de un lactante. (b) Deportistas con el síndrome de Down. (Parte (a) adaptada de F. Vogel y A. G. Motulsky, *Human Genetics*, Springer-Verlag, 1982; parte (b) de Bob Daemmrich/The Image Works.)

tos de varones) produce el *síndrome de Klinefelter*, varones altos y de cuerpo desgarbado que sufren cierto retraso mental y son estériles (Fig. 18-20). Otra combinación, XYY, también ocurre en cerca del 1 por 1000 de los varones. Se han hecho intentos de relacionar la condición XYY con una predisposición hacia la violencia. Este tema todavía se debate apasionadamente, aunque actualmente está claro que una condición XYY no garantiza de ningún modo ese comportamiento. No obstante, algunos abogados han intentado utilizar el genotipo XYY como justificación para pedir la absolución, o una disminución de la pena, en el caso de crímenes violentos. Los varones XYY son generalmente fértiles. Sus meiosis son del tipo XY; el cromosoma Y extra no se transmite y sus gametos contienen X o Y, pero nunca YY o XY.

El tipo más común de aneuploidía viable en los seres humanos es el *síndrome de Down* (Fig. 18-21) que ocurre con una frecuencia del 0.15 % de todos los nacimientos. Ya hemos estudiado en el Capítulo 17 que el síndrome puede aparecer como consecuencia de una translocación. Sin embargo, el tipo más común de síndrome de Down es la trisomía del cromosoma 21 debida a la no disyunción de este cromosoma en un progenitor que es cromosómicamente normal. Como cualquier mecanismo celular, la disyunción cromosómica puede sufrir errores y algunas veces da lugar a gametos aneuploides. En este tipo de síndrome de Down no hay antecedentes familiares de aneuploidía, a diferencia del tipo producido por translocación que hemos tratado anteriormente.

En el síndrome de Down se produce un efecto dependiente de la edad de la madre; las madres de más edad presentan un riesgo muy elevado de tener hijos con el síndrome (Fig. 18-22). Por esa razón, actualmente se recomienda un análisis cromosómico del feto (por amniocentesis o por toma de muestras de las vellosidades coriónicas) de las embarazadas con edad avanzada. Se ha demostrado también un efecto, aunque menos pronunciado, de la edad paterna.

Aunque el efecto dependiente de la edad de la madre se conoce desde hace muchos años, todavía se desconoce su causa. No ob-

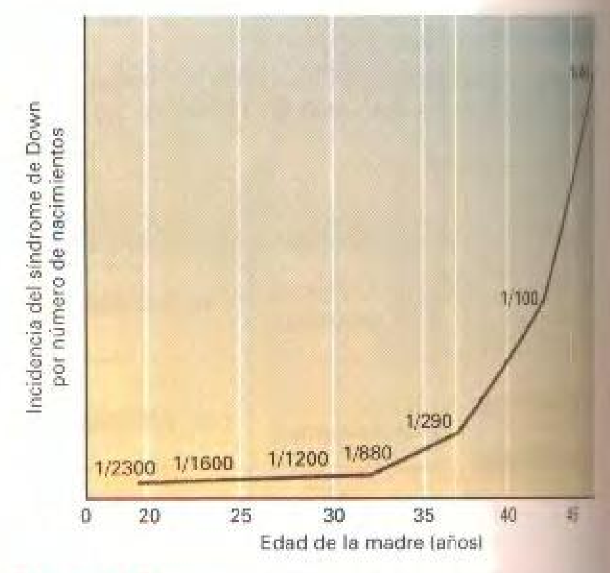


Figura 18-22. Relación entre la edad materna y la aparición del síndrome de Down en la descendencia. (De L. S. Penrose y G. F. Smith, *Down's Anomaly*, Little, Brown & Company, 1966.)

tante, se han establecido algunas correlaciones biológicas interesantes. Es posible que un aspecto del pronunciado efecto de la edad materna sobre la no disyunción, sea un descenso dependiente de la edad en la probabilidad de mantener unidas las tétradas cromosómicas durante la profase I de la meiosis. La parada meiótica de los oocitos (meiocitos femeninos) en la profase I tardía es un fenómeno común en muchos animales. En las mujeres, todos los oocitos están detenidos en diplotene desde antes del nacimiento. La meiosis continúa sólo en cada ciclo menstrual, lo cual significa que los agrupamientos de las tétradas cromosómicas deben mantenerse correctamente durante décadas. Si suponemos que, de forma accidental a lo largo del tiempo, hay una probabilidad creciente de que se rompan tales agrupamientos, podemos explicar el incremento con la edad materna de la frecuencia de no disyunción. Consistente con esta especulación, tenemos la observación de que la mayoría de los casos de no disyunción relacionados con la edad materna se producen en la anafase I, no en la anafase II.

Entre los múltiples fenotipos característicos del síndrome de Down se incluyen retraso mental, con un C. I. entre 20 y 50; cara ancha y achatada; ojos con pliegue epicántico; estatura pequeña; manos cortas con un pliegue que las cruza por el centro, y lengua grande y arrugada. Las mujeres afectadas pueden ser fértiles y tener hijos normales y trisómicos, pero los varones nunca se han reproducido. La esperanza media de vida es de alrededor de 17 años, y solamente el 8 % de los que sobreviven pasa de los 40.

En la especie humana sólo se conocen otros dos tipos de trisómicos para autosomas que sobreviven hasta el nacimiento: los afectados por la trisomía del cromosoma 13 (*síndrome de Patau*) o la del cromosoma 18 (*síndrome de Edwards*). Ambas trisomías dan lugar a graves anormalidades físicas y mentales. El fenotipo generalizado de la trisomía del cromosoma 13 incluye labio leporino, cabeza pequeña y deformada, pies arqueados y una esperanza media de vida de 130 días. El fenotipo de la trisomía del cromosoma 18 incluye posición baja de las orejas, mandíbula pequeña, pelvis estrecha y pies arqueados; casi todos los niños con trisomía del cromosoma 18 mueren durante las primeras semanas después del nacimiento.

En conjunto, las mutaciones cromosómicas desempeñan un papel importante en la determinación de enfermedades genéticas en los seres humanos. La Figura 18-23 resume la incidencia, sorprendentemente elevada, de varias anomalías cromosómicas en distintas etapas del desarrollo del organismo humano. De he-

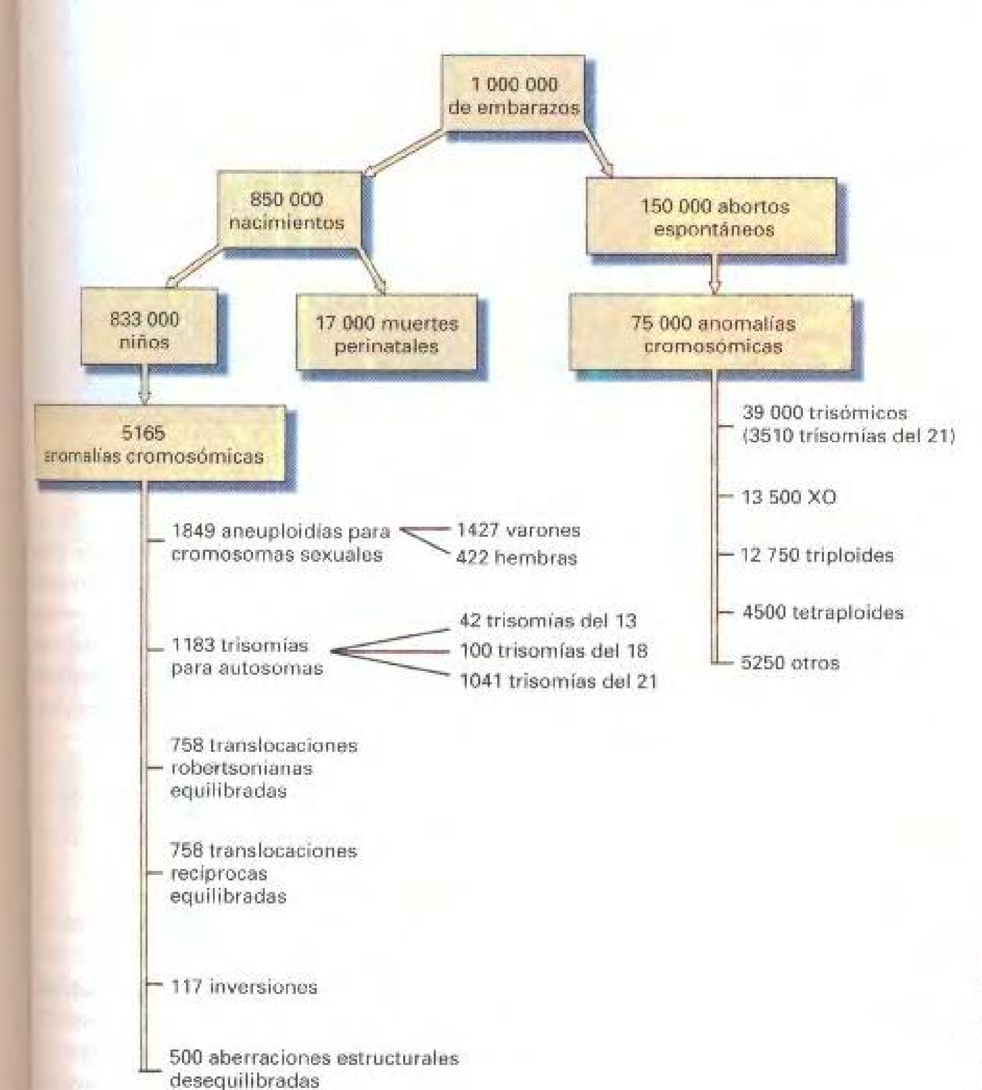


Figura 18-23. Destino de un millón de cigotos humanos implantados. (Las translocaciones robertsonianas implican la fusión o disociación de centrómeros). (Cortesía de K. Sankaranarayanan, *Mutation Research* 61, 1979.)

CUADRO 18-1. Incidencia relativa de las enfermedades humanas debidas a mutaciones génicas y cromosómicas

Tipo de mutación	Porcentaje de nacimientos
Mutaciones génicas	
Dominante autosómica	0.90
Recesiva autosómica	0.25
Ligada al cromosoma X	0.05
Mutaciones génicas totales:	1.20
Mutaciones cromosómicas	
Trisomías autosómicas (principalmente el síndrome de Down)	0.14
Otras aberraciones cromosómicas desequilibradas	0.06
Aberraciones cromosómicas equilibradas	0.19
Cromosomas sexuales	
XYY, XXY y otros ♂♂	0.17
XO, XXX y otras ♀♀	0.05
Mutaciones cromosómicas totales:	0.61

CUADRO 18-2. Número y tipo de anomalías cromosómicas encontradas entre abortos espontáneos y niños nacidos vivos entre 100 000 embarazos

	100 000 EMBARAZOS	
	15 000 abortos espontáneos 7500 cromosómicamente anormales	85 000 nacidos vivos 550 cromosómicamente anormales
Trisomía		
1	0	0
2	159	0
3	53	0
4	95	0
5	0	0
6-12	561	0
13	128	17
14	275	0
15	318	0
16	1229	0
17	10	0
18	223	13
19-20	52	0
21	350	113
22	424	0
Cromosomas sexuales		
XYY	4	46
XXY	4	44
XO	1350	8
XXX	21	44
Translocaciones		
Equilibradas	14	164
No equilibradas	225	52
Poliploidía		
Triploidía	1275	0
Tetraploidía	450	0
Otros (mosaicos, etc.)	280	49
Total:	7500	550

cho, la incidencia de las mutaciones cromosómicas en los recién nacidos se sitúa cerca de la incidencia de las mutaciones génicas (Cuadro 18-1). Este resultado es particularmente sorprendente si tenemos en cuenta que prácticamente todas las mutaciones cromosómicas aparecen *de novo* en cada generación. Por el contrario, la incidencia de las mutaciones génicas (como veremos en el Capítulo 24) se debe a una interacción compleja entre las tasas de mutación y la selección ambiental, que actúa a lo largo de muchas generaciones humanas.

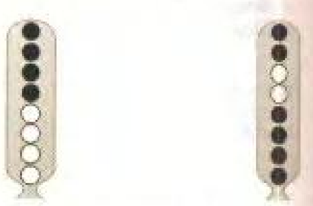
Cuando se comparan las frecuencias de varias mutaciones cromosómicas en niños nacidos vivos y en abortos espontáneos (Cuadro 18-2), queda claro que las alteraciones cromosómicas que conocemos como anormalidades clínicas representan sólo la punta del iceberg. En primer lugar, se observa que se producen muchos más tipos de anomalías de los que detectamos en los recién nacidos; por ejemplo, en los abortos son relativamente comunes los trisómicos para los cromosomas 2, 16 y 22, pero nunca sobreviven. En segundo lugar, las aberraciones específicas que aparecen en nacidos vivos son parte de un número mucho mayor que no sobrevive; por ejemplo, el síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21) se produce con una frecuencia diez veces mayor que la frecuencia que se observa en los nacidos vivos. Aún más sorprendente es el caso del síndrome de Turner (XO). En conjunto, se ha observado que cerca del 10 % de las concepciones presentan alguna anormalidad cromosómica importante; nuestro éxito reproductivo depende de procesos naturales que eliminan la mayoría de esas anormalidades antes del nacimiento. Dicho sea de paso, no hay ninguna prueba que sugiera que tales aberraciones sean consecuencia de ataques ambientales a nuestro sistema reproductor, o que la frecuencia de las aberraciones esté aumentando.

COROLARIO

Los trisómicos muestran los efectos deletéreos del desequilibrio génico y producen variaciones específicas de cromosoma en las frecuencias fenotípicas.

Disómicos ($n + 1$)

Un disómico es una aberración de un organismo haploide. En los hongos, pueden originarse por un fenómeno de no disyunción meiótica. En el hongo *Neurospora* (haploide), un producto meiótico $n - 1$ aborta y no se oscurece como una ascospora normal; podemos detectar no disyunciones MI y MII observando ascas con proporciones 4:4 y 6:2 de ascosporas normales y abortadas, respectivamente, como muestra el dibujo.



Estos diagramas corresponden exactamente a los acontecimientos cromosómicos que se han mostrado en la Figura 18-[illegible]. En estos organismos, el producto meiótico disómico ($n + 1$) da lugar directamente a una estirpe disómica. Los patrones de [illegible]

...os permiten diagnosticar la presencia de disómicos en las ascas. Otra forma de detectar disómicos en los hongos es el cruce entre dos estirpes con cromosomas homólogos portadores de múltiples mutaciones auxotróficas; por ejemplo:

$$\frac{ade\ his^+\ nic\ ala^+\ leu\ arg^+}{\times} \quad \frac{}{ade^+\ his\ nic^+\ ala\ leu^+\ arg}$$

De este cruce, las poblaciones de ascosporas resultantes, se siembran en medio mínimo. Sólo las ascosporas con genotipo + + + + + + pueden crecer y formar colonias. La mayoría de estas colonias son disómicas y no del tipo de entrecruzamiento múltiple.

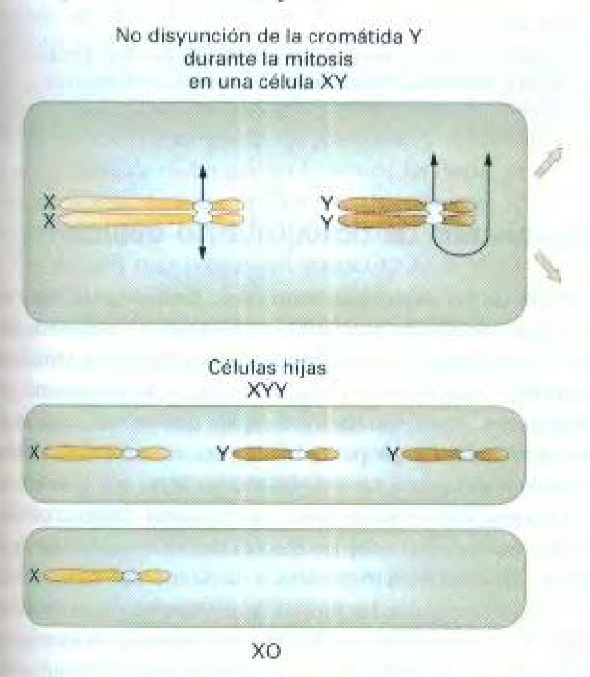
COROLARIO

En los hongos, los disómicos se pueden seleccionar a partir de ascas que muestran patrones especiales de aborto de esporas o como descendencia meiótica que debe contener cromosomas homólogos de ambos parentales.

Aneuploides somáticos

Las células aneuploides pueden originarse espontáneamente en el tejido somático o en cultivo de tejidos. En estos casos, el resultado inicial es un mosaico genético de tipos celulares.

Los mosaicos sexuales (individuos cuyo cuerpo es una mezcla de células femeninas y masculinas) constituyen un buen ejemplo. Un tipo de mosaico sexual, el XO/XYY, puede explicarse a partir de un cigoto XY en el que no se produce disyunción de las cromátidas Y durante una división mitótica temprana, por lo que ambas migran hacia el mismo polo.



El sexo fenotípico de estos individuos depende de la parte del cuerpo donde terminen formándose los sectores masculinos y femeninos. En las situaciones que estamos considerando, un fenómeno de no disyunción en una división mitótica tardía produce un mosaico de tres tipos celulares (XY) (XO) (XYY), que incluye un clon de células masculinas normales. La explicación de otros mosaicos sexuales es diferente; como ejemplos, XO/XY se debe, probablemente, a una pérdida temprana del cromosoma Y en un cigoto macho (Fig. 18-24), y (XX) (XY) es probablemente el resultado de una doble fertilización (gemelos fusionados). En general, los mosaicos sexuales se denominan *ginandromorfos*.

Ocasionalmente, los genetistas que trabajan con muchas especies de animales de experimentación encuentran ginandromorfos en sus colecciones. Un ejemplo clásico es el de *Drosophila* que se ilustra en la Figura 18-25. En este caso, el cigoto comenzó como una hembra heterocigótica para dos genes ligados al cromosoma X, ojo blanco y ala pequeña ($w^+\ m^+/w\ m$).

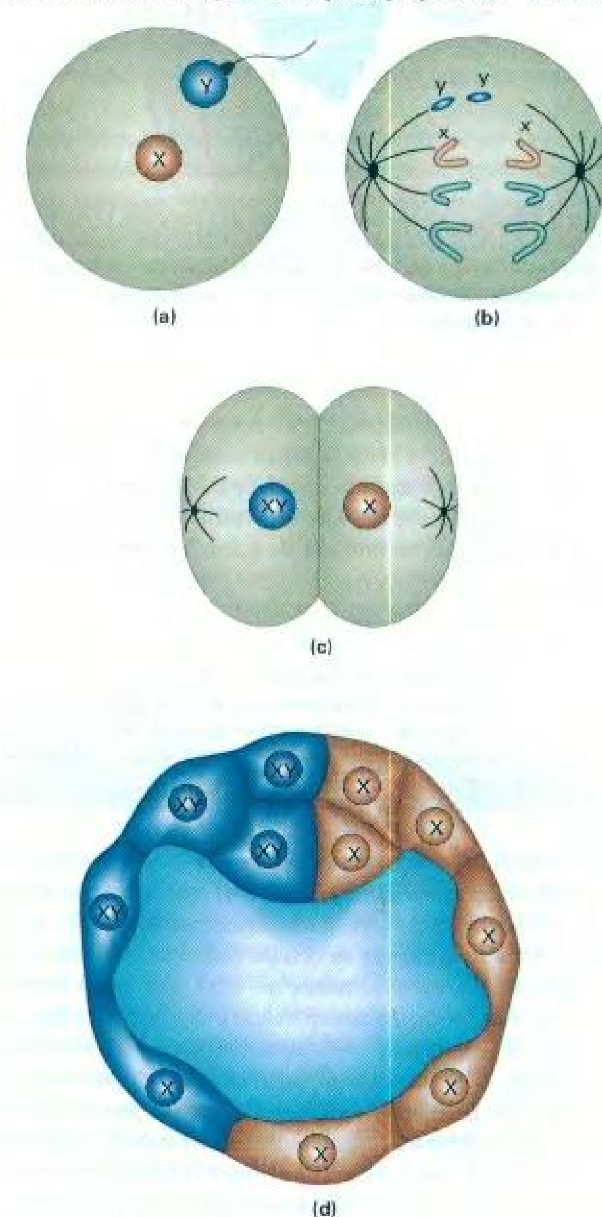


Figura 18-24. Origen de un mosaico sexual humano (XY) (XO) por pérdida del cromosoma Y en la primera división mitótica del cigoto. (a) Fecundación. (b) Pérdida del cromosoma. (c) Células masculinas y femeninas resultantes. (d) Blastocisto mosaico. (Adaptado de C. Stern, *Principles of Human Genetics*, 3.ª Ed. W. H. Freeman and Company, 1973.)

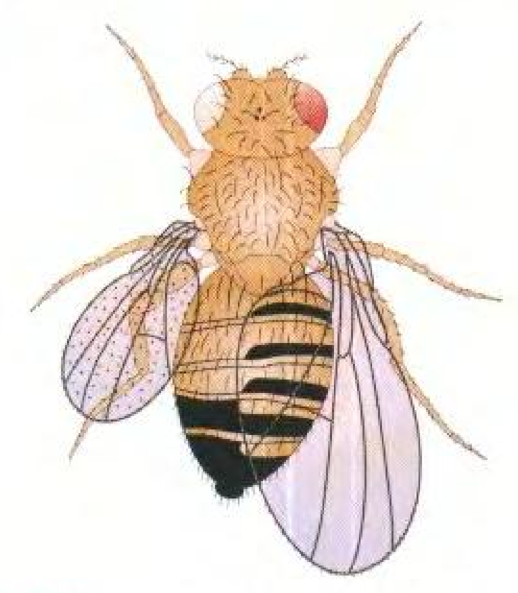


Figura 18-25. Ginandromorfo bilateral de *Drosophila*. El cigoto era $w^+ m^+/w\ m$, pero la pérdida del cromosoma $w^+ m^+$ en la primera división mitótica produjo una mosca que era $\frac{1}{2}$ $O/w\ m$ y macho (izquierda) y $\frac{1}{2}$ $w^+ m^+/w\ m$ y hembra (derecha). El alelo mutante *w* da lugar a ojos blancos y *m* da lugar a alas pequeñas.



Figura 18-26. Ginandromorfo bilateral de la polilla Io, *Automeris io*. La mitad del cuerpo es hembra y lleva la mutación «ojo roto» en el cromosoma sexual; la otra mitad del cuerpo es macho y lleva el alelo normal del gen «ojo roto». Esta polilla apareció como consecuencia de un hecho similar al que produjo el ginandromorfo de *Drosophila* de la Figura 18-25. Las diferencias en el color y el tamaño son características sexuales. (E. R. Manley.)

La pérdida del cromosoma X silvestre en la primera división mitótica dio lugar a las dos líneas celulares y, finalmente, a una mosca que presenta la mitad de su cuerpo diferente a la otra respecto al sexo, al color de los ojos y al tamaño del ala. En la Figura 18-26 se muestra un ginandromorfo similar de la polilla Io.

COROLARIO

La no disyunción mitótica y otros tipos de comportamientos cromosómicos mitóticos aberrantes pueden dar lugar a mosaicos que consisten en dos o más tipos de células cromosómicamente distintas, incluyendo células aneuploides.

La aneuploidía somática y sus mosaicos resultantes suelen aparecer asociados al cáncer. Los individuos que padecen leucemia mieloide crónica (LMC), un cáncer que afecta a los leucocitos, suelen ser portadores de células con el denominado cromosoma Filadelfia. Anteriormente se creía que este cromosoma reflejaba una condición aneuploide, pero ahora se sabe que es producto de una translocación en la que parte del brazo largo del cromosoma 22 se ha unido al brazo largo del cromosoma 9. Sin embargo, los pacientes con LMC además del cromosoma Filadelfia suelen presentar aneuploidía. En un estudio de 67 enfermos de LMC, 33 presentaron un cromosoma Filadelfia adicional y los restantes sufrían varias aneuploidías; la aneuploidía más frecuente era la trisomía para el brazo largo del cromosoma 17, que se detectó en 28 personas. De 58 individuos con leucemia mieloide aguda, 21 mostraron aneuploidía para el cromosoma 8; 16 para el cromosoma 9; y 10 para el cromosoma 21. En otro estudio de 15 pacientes con tumor intestinal, 12 presentaron células con cromosomas anormales, y al menos algunos de ellos mostraron trisomía para el cromosoma 8, 13, 15, 17 ó 21. Por supuesto, este tipo de estudios sólo establece correlaciones, y no está claro si las anormalidades deben considerarse como causa o consecuencia del cáncer.

COROLARIO

Los aneuploides se producen por falta de disyunción o algún otro tipo de reparto cromosómico defectuoso tanto en la meiosis como en la mitosis.

Mecanismos de desequilibrio génico

Al hablar de las euploidías anormales, hemos hecho notar que existe una correlación entre el incremento en el número de dotaciones cromosómicas completas y el incremento de tamaño del organismo, sin que se vean muy afectadas su forma general y sus proporciones. Por el contrario, es típico que las aneuploidías alteren la forma y las proporciones de una manera característica. Las plantas tienden a ser más tolerantes a las aneuploidías que los animales. Los estudios con el estramonio, *Datura*, constituyen un ejemplo clásico de los efectos de las aneuploidías y poliploidías. El número cromosómico haploide del estramonio es 12. Como se esperaba, las proporciones morfológicas de la planta poliploide son como las del diploide normal, aunque es más grande. Por el contrario, los 12 trisómicos posibles resultan desproporcionados, si bien cada uno de ellos de una manera distinta, como ponen de manifiesto los cambios en la forma de sus frutos (véase la Fig. 3-7). Las 12 trisomías posibles conducen a 12 formas diferentes y características del fruto. Ciertamente, éstos y otros rasgos de cada trisomía resultan tan fiables que los síndromes fenotípicos se emplean para identificar las plantas portado-

más de una trisomía completa. De forma similar, las 12 monosomías son, a su vez, diferentes unas de otras y de las trisomías. En general, un monosómico para un cromosoma completo resulta más anormal que el trisómico correspondiente.

Podemos observar también tendencias similares en los animales. En la mosca del vinagre, *Drosophila*, los únicos aneuploides autosómicos que alcanzan la edad adulta son los trisómicos y los monosómicos para el cromosoma 4, el cromosoma más pequeño de *Drosophila*, que representa sólo entre el 1 y el 2 % del genoma. Las moscas trisómicas para el cromosoma 4 están sólo ligeramente afectadas y son mucho menos anormales que las moscas monosómicas para el 4. En los seres humanos, no llega a nacer ningún monosómico autosómico, mientras que sí sobreviven tres tipos de autosómicos, como se mencionó con anterioridad. Como ocurre con los aneuploides del estramonio, cada una de las tres trisomías genera un síndrome fenotípico único, debido a los efectos especiales de la alteración en la dosis de uno u otro cromosoma.

¿Por qué son los aneuploides más anormales que los poliploides? ¿Por qué los aneuploides para cromosomas diferentes muestran cada uno anormalidades fenotípicas características? ¿Y por qué los monosómicos resultan estar afectados, en general, de manera más grave que los trisómicos correspondientes? La respuesta parece ser ciertamente una cuestión de **equilibrio génico**. En un euploide, la proporción entre el número de genes de cualquier cromosoma y el de otro cromosoma es 1:1 (o sea, 100 %), con independencia de si hablamos de monoploides, diploides, triploides o tetraploides. En un aneuploide, por el contrario, la proporción entre los genes del cromosoma aneuploide y los genes de otros cromosomas difiere de la del silvestre en un 50 % (50 % en los monosómicos; 150 % en los trisómicos). Vemos, pues, que los genes aneuploides están desequilibrados.

Un factor clave deriva de que, en general, la cantidad de transcrito producido por un gen es directamente proporcional al número de copias de dicho gen en la célula. Es decir, para un gen concreto, la tasa de transcripción está directamente relacionada con el número de moldes de DNA. Por tanto, cuantas más copias existan del gen más copias del transcrito se producirán. Dada esta relación gen-dosis, los *aneuploides parciales*, en los que sólo *parte* de un cromosoma tiene la condición de trisómico o monosómico (en concreto, las duplicaciones y las deleciones), han demostrado ser muy útiles para localizar las posiciones de genes que determinan varias enzimas celulares. La estrategia consiste en buscar segmentos del genoma cuyo número de dosis correlacione con cambios proporcionales en la concentración de una enzima determinada. Esta estrategia se ha utilizado con profusión en la mosca *Drosophila*, en la que, mediante este procedimiento, ha habido un 90 % de éxito en la identificación de genes que determinan enzimas.

Podemos inferir que la fisiología normal de una célula depende de la correcta proporción de los distintos productos génicos que se producen en la situación euploide. Éste sería el equilibrio génico normal. Si cambia la dosis relativa de algunos genes —por ejemplo, por la eliminación de una de las dos copias de un cromosoma o de un segmento del mismo— se producen desequilibrios fisiológicos en las rutas celulares.

En algunos casos, los desequilibrios de una aneuploidía se deben a unos pocos genes «principales». Tales genes pueden considerarse como haplo-anormales o triplo-anormales, o ambas cosas, y contribuyen de forma significativa al síndrome fenotípico aneuploide. Por ejemplo, el estudio de personas trisómicas sólo para parte del cromosoma 21 ha permitido localizar determinantes específicos del síndrome de Down en varias regiones del cromosoma 21, indicando que algunos aspectos del fenotipo se deben a la trisomía de genes principales concretos situados en esas regiones cromosómicas. Además del efecto de los genes principales, otros aspectos de los síndromes aneuploides se deben probablemente al efecto acumulativo de la aneuploidía de numerosos genes cuyos productos están todos en desequilibrio. Sin duda, el fenotipo aneuploide completo es una síntesis de los efectos del desequilibrio de unos pocos genes principales, junto a los desequilibrios acumulados de muchos genes de menor importancia.

Sin embargo, la idea del desequilibrio génico no explica por qué una cantidad escasa de productos génicos (monosomía) resulta más grave que un exceso de los mismos (trisomía). En esta línea, en organismos bien estudiados, se conocen muchos más casos de genes haploanormales que triploanormales. Un factor importante para explicar las anormalidades de los monosómicos es el hecho de que cualquier alelo recesivo deletéreo presente en el autosoma se manifestará automáticamente. Este mismo efecto es relevante para las deleciones cromosómicas.

¿Cómo aplicar la idea del equilibrio génico a los casos de las aneuploidías de los cromosomas sexuales? El equilibrio génico es aplicable a los cromosomas sexuales, pero también debemos tener en cuenta sus propiedades especiales. En los organismos con determinación sexual X-Y, el cromosoma Y parece ser un cromosoma X degenerado que posee sólo unos pocos genes funcionales, además de los implicados en la propia determinación del sexo, en la producción de esperma, o ambos. Por su parte, el cromosoma X contiene muchos genes implicados en procesos celulares básicos («genes de labores caseras»), que estaban situados en el cromosoma que en cierto momento evolucionó hasta convertirse en el cromosoma X. El mecanismo de determinación X-Y surgió en la evolución, de forma independiente, unas 10 a 20 veces en distintos grupos taxonómicos. Así, parece haber un mecanismo de determinación del sexo común a todos los mamíferos, pero es completamente diferente del mecanismo X-Y que gobierna la determinación del sexo en la mosca del vinagre.

En cierto sentido, los cromosomas X son naturalmente aneuploides. Las hembras poseen dos de ellos, mientras que los machos poseen uno sólo. Sin embargo, se ha descubierto que la concentración de los productos de los genes «caseros» es la misma en las células femeninas y masculinas. ¿Cómo ocurre esto? La respuesta depende del organismo. En la mosca del vinagre, el cromosoma X de los machos parece estar «superactivado» de manera que se transcribe a doble velocidad que cualquiera de los cromosomas X de las hembras. En los mamíferos, por el contrario, la regla es que no importa cuántos cromosomas X estén presentes, sólo uno de ellos es activo transcripcionalmente en cada célula somática. Esta compensación de la dosis se lleva a cabo mediante la inactivación aleatoria de un cromosoma X. (Una persona con dos o más cromosomas X es un mosaico de dos o más tipos celulares en los que sólo uno o el otro cromosoma X es

activo). Así pues, los individuos XY y XX producen la misma cantidad de los productos de los genes caseros. La inactivación del cromosoma X explica también por qué las personas triple-X son fenotípicamente normales, puesto que en cada célula tan sólo uno de los tres cromosomas X es activo transcripcionalmente. De forma similar, un varón XXY resulta estar sólo moderadamente afectado ya que sólo uno de los dos cromosomas X de sus células es activo.

¿Por qué los varones XXY muestran alguna anormalidad, mientras que las mujeres triple-X son fenotípicamente normales? Ciertas regiones del cromosoma X no se inactivan por el mecanismo de compensación de dosis. En los varones XXY, estas regiones se expresan a un nivel doble que las mismas regiones en los varones XY. Este elevado nivel parece tener como consecuencia una cierta feminización fenotípica en los varones XXY, aunque actualmente desconocemos qué genes concretos de las regiones citadas contribuyen a ese efecto. En las mujeres XXX, por otro lado, las regiones citadas se activan hasta un nivel sólo 1.5 veces mayor que en las mujeres normales XX. Este grado menor de aneuploidía funcional en las mujeres XXX respecto a los varones XXY, más el hecho de que los genes implicados provocan feminización, puede explicar el fenotipo feminizado de los individuos XXY. La gravedad de la condición XO, el síndrome de Turner, puede explicarse por el considerable efecto deletéreo de la monosomía de las regiones del X no sometidas a compensación de dosis. Como ocurre normalmente con los aneuploides, la monosomía de esas regiones del cromosoma X provoca un fenotipo más anormal que la presencia de una copia extra de la misma región (mujeres triple-X o varones XXY).

Los cigotos humanos poliploides surgen mediante varios tipos de errores de la división celular. La mayoría mueren en el útero. Se conocen casos raros de nacimientos triploides, pero ninguno ha sobrevivido. Este hecho parece contradecir el postulado establecido anteriormente en este mismo apartado, esto es, que los poliploides son más normales que los aneuploides. La explicación de esta contradicción parece estar en la compensación de dosis del cromosoma X. Parte de la norma de un cromosoma X activo parece consistir en que haya un solo cromosoma X activo por cada dos copias de la dotación autosómica completa. Así resulta que un mamífero triploide contiene células con un solo X activo y células con dos X activos. Ninguna de ambas situacio-

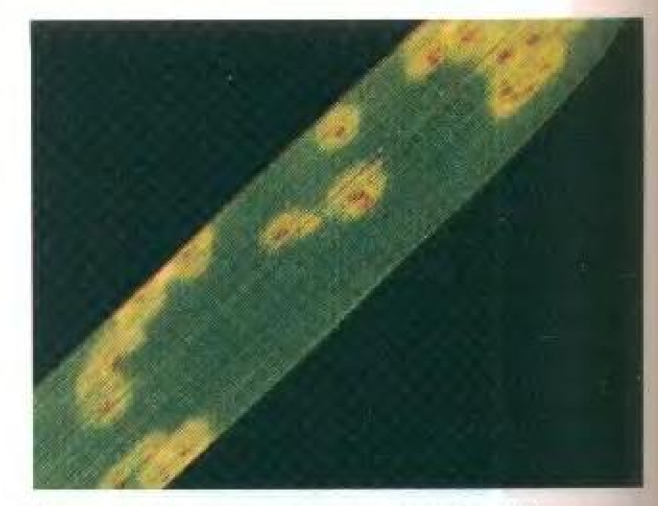


Figura 18-27. Hoja de trigo infectada por el hongo del tizón, cuyo nombre proviene de las manchas coloreadas producidas por las esporas del hongo en los centros de infección. Varios tipos de hongos del tizón son patógenos de cosechas muy importantes, como cereales, pinos y café. La infección por el hongo del tizón produce pérdidas anuales de miles de millones de dólares, y gran parte de la mejora genética vegetal se dedica a la obtención de líneas de plantas genéticamente resistentes. (V. A. Wilmot/ Visuals Unlimited.)

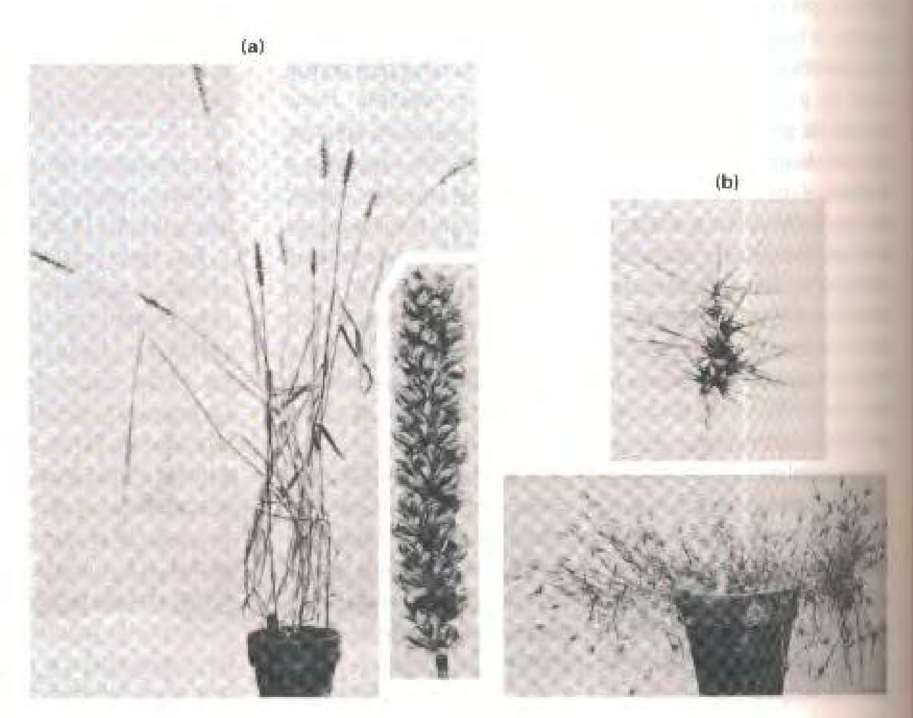


Figura 18-28. (a) Trigo. (b) *Aegilops umbellulata*. Se muestran las plantas completas y las semillas. (Cortesía de E. R. Sears.)

nes está en equilibrio con los genes autosómicos. La baja activación funcional de los genes caseros (en células $3n$ con un solo X activo), o la alta activación funcional de esos mismos genes (en células $3n$ con dos X activos) provocaría una grave aneuploidía funcional y la inviabilidad de los individuos triploides.

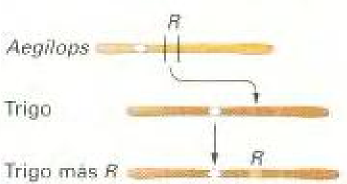


Figura 18-30. Translocación del segmento *R* de *Aegilopa* al trigo utilizando la radiación como agente inductor de roturas cromosómicas.

Mecánica cromosómica en la mejora genética vegetal

Lo que conocemos acerca de las mutaciones cromosómicas se puede utilizar para el diseño genético de nuevas variedades, permitiendo la producción y el mantenimiento de nuevas variantes cultivables en nuestro mundo escaso de alimentos. El ejemplo clásico, realizado por E. R. Sears en los años 50 implica la transferencia de un gen que confiere resistencia al tizón en las hojas desde una hierba silvestre, *Aegilops umbellulata*, al trigo del pan, que es muy susceptible de ser atacado por esta enfermedad, para solucionar un problema importante en la industria del trigo (Fig. 18-27).

El primer problema que tuvo que afrontar Sears fue que estas dos especies (Fig. 18-28) no pueden cruzarse entre sí, por lo que conseguir la transferencia génica parecía imposible. Sears esquivó este problema mediante un cruzamiento puente, en el que cruzó *A. umbellulata* con una especie emparentada con el trigo del pan llamada Emmer, *Triticum dicoccoides*. (Puede seguir el proceso en la Fig. 18-29). *A. umbellulata* es un diploide $2n = 2x = 14$. Llamaremos CC a sus dotaciones cromosómicas. *T. dicoccoides* es un tetraploide en el que $2n = 4x = 28$, con las dotaciones AA BB. De este cruzamiento, el híbrido estéril resultante ABC, se sometió a duplicación de sus cromosomas para dar el anfidiploide fértil AA BB CC de 42 cromosomas. Este anfidiploide se comportaba como fértil en los cruzamientos con el trigo (*T. aestivum*), que se representa como $2n = 6x = 42$, AA BB DD. Los descendientes AA BB CD, resultaron casi completamente estériles debido a las irregularidades en el apareamiento entre los cromosomas de las series C y D. No obstante, los cruzamientos con el trigo produjeron semillas con baja frecuencia, algunas de las cuales dieron lugar a plantas resistentes. Algunas de ellas correspondían al tipo deseado, portadoras de 43 cromosomas (de los cuales 42 eran del trigo, y el otro restante de *Aegilops*, que contenía el gen de la resistencia). Esto indica que en el híbrido AA BB CD ocurrió algún tipo de segregación cromosómica anormal que produjo un gameto con 22 cromosomas: ABD más uno del grupo C.



Figura 18-29. Esquema del procedimiento seguido por Sears para ...ucir la resistencia al tizón de *Aegilops* al trigo. A, B, C y D representan ...aciones cromosómicas de distinto origen. *R* representa el determinante ...ético (¿un solo gen?) de la resistencia.

Por desgracia, el cromosoma adicional era portador de demasiados genes indeseables de *Aegilops*, además del que confería la resistencia, y las plantas eran endebles y poco productivas. Por esta razón, debía eliminarse el ligamiento entre los genes de *Aegilops*. Sears lo llevó a cabo utilizando polen irradiado de estas plantas para polinizar trigo. Buscaba translocaciones de parte del cromosoma de *Aegilops* a cromosomas del trigo. Encontró que eran bastante frecuentes, aunque sólo una resultó adecuada, una translocación insercional, unidireccional, muy pequeña (Fig. 18-30). Cuando se hicieron homocigóticas, las plantas resistentes fueron indistinguibles del trigo.

Obviamente, el estudio de las mutaciones cromosómicas tiene gran importancia, no sólo en Biología pura, de la que surgen ramificaciones a partir de muchas áreas (especialmente en la evolución), sino también en Biología aplicada. La aplicación de estos estudios resulta de particular importancia en la agricultura y la medicina. Aunque parezca extraño, se sabe muy poco acerca de los mecanismos responsables de las mutaciones cromosómicas, especialmente a nivel molecular. Se necesitan más detalles sobre la arquitectura química normal de los cromosomas.

RESUMEN

Cuando las mutaciones cromosómicas afectan a toda una dotación cromosómica, se producen euploides anormales; cuando las mutaciones cromosómicas modifican únicamente el número de una parte de la dotación cromosómica, se producen aneuploides.

Los poliploides, como los triploides ($3x$) y los tetraploides ($4x$), son comunes en el reino vegetal e incluso están representados en el reino animal. Un número impar de dotaciones cromosómicas conduce a esterilidad debido a la presencia de cromosomas no apareados durante la meiosis, mientras que un número par de dotaciones puede producir proporciones de segregación típicas (aunque anormales). Los alopoliploides (poliploides formados por combinación de dotaciones de especies distintas) pueden construirse mediante cruzamiento entre dos especies relacionadas y posterior duplicación de los cromosomas de la descendencia por tratamiento con colchicina o por fusión celular somática. Estas técnicas tienen importantes aplicaciones en la mejora vegetal, ya que los alopoliploides son en realidad especies nuevas. La poliploidía suele producir organismos de dimensiones mayores. Este descubrimiento ha permitido que se logren importantes avances en agricultura y en el área de la mejora genética vegetal.

Los aneuploides han sido también importantes en la construcción de plantas con genotipos concretos, aunque la aneuploidía *per se* suele producir un genotipo desequilibrado que se manifiesta en un fenotipo anormal. Entre los ejemplos de aneuploides se incluyen los monosómicos ($2n - 1$) y los trisómicos ($2n + 1$). Se han estudiado con detalle las condiciones aneuploides humanas. El síndrome de Down (trisomía del 21), el síndrome de Klinefelter (XXY) y el síndrome de Turner (XO), son ejemplos bien documentados. La frecuencia espontánea de aneuploidías en los seres humanos es bastante elevada y son la causa de una proporción considerable de las enfermedades genéticas que padece la población humana. Se cree que la aneuploidía se produce en gran parte como consecuencia de una falta de disyunción cromosómica.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

euploide / desequilibrio / no disyunción / meiosis / gametos / esterilidad / aneuploide / proporciones fenotípicas / aborto / mitosis / genes

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

Tenemos dos líneas puras de ratón para dos fenotipos alternativos de comportamiento, los cuales sabemos que están determinados por dos alelos situados en un mismo locus: *v* da lugar a un ratón con un modo de andar «tambaleante», mientras que *V* determina un paso normal. Tras cruzar una línea pura tambaleante con una línea pura normal, se observa que la mayor parte de la F_1 es normal. No obstante, de forma inesperada, aparece una hembra tambaleante. Al cruzar esta hembra tambaleante con dos machos tambaleantes distintos, todos los descendientes son tambaleantes. Cuando cruzamos la hembra tambaleante con machos normales, todos los descendientes son normales (no aparece ningún tambaleante). Cruzamos tres de estos descendientes, hembras normales, con dos de sus hermanos y se producen 60 descendientes, todos normales. Sin embargo, cuando cruzamos una de esas mismas hembras con un tercer hermano, obtenemos una descendencia de ocho individuos, de los cuales seis son normales y dos tambaleantes. Si pensamos en los parentales de la hembra F_1 tambaleante, podemos considerar varias explicaciones a estos resultados:

a. Un alelo dominante puede haber mutado a recesivo en el parental normal.

b. Puede haber ocurrido una mutación supresora de *V* en un parental.

c. En el parental normal, un fenómeno de no disyunción meiótica del cromosoma portador de *V* puede haber dado lugar a un aneuploide viable.

d. Puede haberse dado una deleción viable que cubre la región *V* en el meiocito del parental normal.

¿Cuáles de estas explicaciones son posibles, y cuáles pueden ser descartadas mediante análisis genético? Explíquelo con detalle.

♦ Solución ♦

Este problema nos ayudará a utilizar conceptos del Capítulo 4 (supresión), Capítulo 15 (mutación), Capítulo 17 (deleción) y del presente capítulo (no disyunción). El mejor modo de resolverlo es ir considerando las explicaciones una a una e ir comprobando si cada una de ellas concuerda con los resultados del enunciado del problema.

a. Mutación *V* a *v*. Esta hipótesis requiere que la hembra tambaleante excepcional sea homocigótica *v/v*. Esto es compatible con los resultados de los cruzamientos con los machos tambaleantes, que producirían (si ella es *v/v*) descendientes todos ellos tambaleantes (*v/v*), y con los machos normales, que darían lugar a una descendencia normal de genotipo *V/v*. Sin embargo, los cruzamientos entre hermanos normales de la descendencia deberían generar una proporción 3:1 entre normales y tambaleantes. Dado que dos de los cruzamientos entre hermanos no dieron lugar a tambaleantes, esta hipótesis no explica los datos.

b. Mutación supresora de *s* a *S*. En este caso, los parentales serían *V/V* ; *s/s* y *v/v* ; *s/s*, y una mutación germinal en uno de

ellos daría lugar a un individuo tambaleante en la F_1 de genotipo *V/v* ; *S/s*. Si cruzamos esta hembra con un macho tambaleante, cuyo genotipo sería *v/v* ; *s/s*, esperaríamos algunos individuos *V/v* ; *s/s* en la descendencia, por supuesto, fenotípicamente normales. Sin embargo, hemos visto que no aparecieron descendientes normales en este cruzamiento, por lo que la hipótesis queda descartada. Sólo un posible ligamiento podría salvarla, si asumiéramos que la mutación ocurrió en el parental normal, produciendo un gameto *V S*. En este caso, la hembra tambaleante de la F_1 sería *V S/v s*, y si existiese un grado de ligamiento suficiente, no se producirían gametos *V s*, o se producirían muy pocos, siendo este tipo de gametos los necesarios para combinar con los *v s* del macho y dar lugar a los descendientes *V s/v s* normales. Sin embargo, si esto fuera cierto, el cruzamiento con los machos normales debería haber sido *V S/v s* × *V s/V s*, y habría dado un alto porcentaje de descendientes *V S/V s* que serían tambaleantes. Por supuesto, no se encontraron descendientes de este tipo.

c. No disyunción en el parental normal. Esta posibilidad daría lugar a la generación de un gameto nulisómico que se combinaría con *v* para dar lugar al individuo tambaleante de la F_1 que sería hemicigótico para *v*. Los cruzamientos subsiguientes se explicarían como se indica a continuación:

- *v* × *v/v* da lugar a descendientes *v/v* y *v*, todos tambaleantes. Esto concuerda con los datos.
- *v* × *V/V* da lugar a descendientes *V/v* y *V*, todos normales. Esto también concuerda.
- Primeros cruzamientos entre descendientes normales: *V* × *V*. Esto da lugar a *V* y *V/V*, los cuales son todos normales. Esto concuerda con los datos.
- Segundo cruzamiento entre descendientes normales: *V* × *V/v*. Produce un 25 % de cada uno de los individuos *V/V*, *V/v*, *V* (todos normales), y *v* (tambaleantes). Concuerda con los datos.

Por tanto, esta hipótesis es consistente con los datos.

d. Deleción de *V* en el parental normal. Vamos a llamar *D* a la deleción. La descendencia F_1 tambaleante sería *D/v*, y los subsiguientes cruzamientos serían como sigue:

- *D/v* × *v/v*. Da lugar a *v/v* y *D/v*, todos los cuales son ondulantes. Esto concuerda con los datos.
- *D/v* × *V/V*. Da lugar a *V/v* y *D/V*, todos los cuales son normales. Concuerda con los datos.
- Primeros cruzamientos entre descendientes normales: *D/V* × × *D/V*. Da lugar a *D/V* y *V/V*, siendo todos normales. Esto también concuerda.
- Segundo cruzamiento entre descendientes normales: *D/V* × *V/v*. Da lugar a un 25 % de *V/V*, de *V/v*, de *D/V* (todos normales) y de *D/v* (tambaleantes). Esto concuerda con los datos.

De nuevo, la hipótesis es coherente con los datos, de modo que tenemos dos hipótesis compatibles con los resultados y serían necesarios otros experimentos para poder distinguir entre las dos. Una forma obvia sería examinar los cromosomas de la hembra F_1 excepcional al microscopio: la aneuploidía sería relativamente fácil de distinguir de la deleción.

Problemas Resueltos

1. Existe cierta controversia en relación al tipo de apareamiento cromosómico existente en los autotetraploides formados entre dos razas geográficas de una determinada planta. Se sabe que la asociación cromosómica tiene lugar en parejas, pero se barajan tres hipótesis sobre el modo en que ocurre:

   a. Las parejas se forman al azar.

   b. Las parejas se forman sólo entre cromosomas de la misma raza.

   c. Las parejas se forman entre cromosomas de distinta raza.

   Considere un locus *A*, que está estrechamente ligado al centrómero. Se realiza el siguiente cruzamiento:

   Raza 1 : *A/A/A/A* × Raza 2 : *a/a/a/a*

   ↓

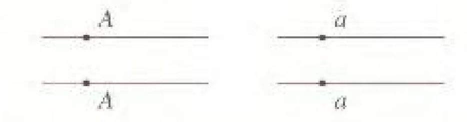
   Autotetraploide: *A/A/a/a*

   A continuación, el autotetraploide se autofecunda. ¿Qué proporción de fenotipos cabe esperar según cada una de las hipótesis de apareamiento cromosómico? Explique su respuesta.

Solución ♦

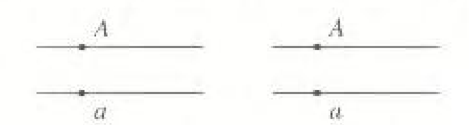
a. Cuando el apareamiento ocurre al azar, todas las combinaciones son igualmente probables. Si marcamos los cuatro cromosomas homólogos como 1, 2, 3 y 4, las combinaciones igualmente probables serán 1-2/3-4, 1-3/2-4 y 1-4/2-3. Este tipo de situación en un tetraploide *A/A/a/a* se analizó en este capítulo (véase la pág. 560). Vimos que los gametos *a/a* se producen con una frecuencia de $\frac{1}{6}$ y que la frecuencia de descendientes *a/a/a/a* cuando se produce autofecundación es $\frac{1}{36}$. Los descendientes de los tipos restantes contendrán al menos un alelo *A*. Por tanto, la proporción esperada será 35 *A/—/—/—* : 1 *a/a/a/a*.

b. En esta alternativa, los pares cromosómicos tendrán el siguiente aspecto:

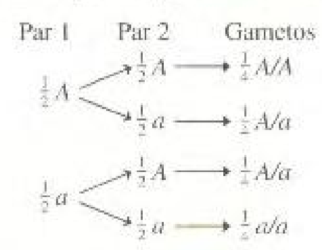


debido a que los dos cromosomas *A* proceden de la raza 1 y los dos cromosomas *a* proceden de la raza 2. El diagrama es un ejemplo de cómo un trabajo metódico nos puede ayudar a resolver un problema, ya que deja perfectamente claro que la única segregación posible es aquella en la que migra un *A* y un *a* a cada polo. Por consiguiente, todos los gametos serán *A/a* y, tras la autopolinización, todos los individuos serán de genotipo *A/A/a/a*, y el único fenotipo será el A.

c. En este caso, las parejas tendrán el siguiente aspecto:



Debido a que la segregación de las parejas es independiente, la población de gametos puede representarse como:



La autofecundación produciría una descendencia *a/a/a/a* con una frecuencia de $\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{16}$. Por tanto, $\frac{15}{16}$ de la descendencia son *A/—/—/—*, y la proporción obtenida será 15:1.

En conclusión, las proporciones del fenotipo A respecto del *a* serán en cada caso:

a. 35:1

b. 1:0

c. 15:1

2. Dado el pequeño tamaño del cromosoma 4 de *Drosophila*, los monosómicos y los trisómicos para este cromosoma son viables, pero los tetrasómicos y los nulisómicos no lo son. Una mosca trisómica para el cromosoma 4 y portadora de un alelo recesivo que determina cerdas curvadas (*b*) en todas las copias del cromosoma 4, se cruza con una mosca fenotípicamente normal que es monosómica para el cromosoma 4:

a. ¿Qué genotipos y fenotipos se esperarían en la descendencia y en qué proporciones?

b. Si los trisómicos de la descendencia se cruzan entre sí, ¿qué proporción fenotípica se esperaría en la siguiente generación? Suponga que sólo se necesita una copia b^+ para que se produzcan cerdas normales (no curvadas), que los cromosomas no apareados se dirigen a cualquiera de los polos al azar y que los gametos aneuploides de cualquier tipo sobreviven.

♦ Solución ♦

a. El cruzamiento sería:

4 —— *b*
4 —— *b*
4 —— *b*

4 —— b^+

Los gametos del parental con cerdas curvadas serán $\frac{1}{2}$ *b/b* y $\frac{1}{2}$ *b*. Los gametos del parental monosómico serán $\frac{1}{2}$ b^+ y $\frac{1}{2}$ 0 (este último no contendrá ningún cromosoma 4). Por lo tanto, la descendencia será $\frac{1}{4}$ $b^+/b/b$, $\frac{1}{4}$ *b/b*, 1/4 b^+/b y $\frac{1}{4}$ *b*, que se traduce en una proporción fenotípica 1:1.

b. Los trisómicos a los que nos referimos son de genotipo $b^+/b/b$. Si marcamos estos cromosomas como 1, 2 y 3, entonces,

$$1 = b$$
$$2 = b$$
$$3 = b^+$$

y la segregación produce

1, 2 (b/b)/3 (b^+)
1, 3 (b/b^+)/2 (b)
2, 3 (b/b^+)/1 (b)

La fecundación se puede representar:

	$b/b(\frac{1}{6})$	$b^+/b(\frac{2}{6})$	$b(\frac{2}{6})$	$b^+(\frac{1}{6})$
$b/b(\frac{1}{6})$	X	X	**b/b/b** $\frac{2}{36}$	$\frac{1}{36}$
$b^+/b(\frac{2}{6})$	X	X	$\frac{4}{36}$	$\frac{2}{36}$
$b(\frac{2}{6})$	**b/b/b** $\frac{2}{36}$	$\frac{4}{36}$	**b/b** $\frac{4}{36}$	$\frac{2}{36}$
$b^+(\frac{1}{6})$	$\frac{1}{36}$	$\frac{2}{36}$	$\frac{2}{36}$	$\frac{1}{36}$

Las X representan tetrasómicos, que no son viables. De las restantes $\frac{27}{36}$, $\frac{8}{36}$ son de fenotipo *b*; por lo tanto, se predice una proporción 19:8.

PROBLEMAS

1. Indique las diferencias entre los síndromes de Klinefelter, de Down y de Turner en los seres humanos.

2. Exponga dos métodos para construir un alotetraploide entre dos especies de plantas relacionadas, ambas con $2n = 28$.

3. a. Suponga que se produce la no disyunción del cromosoma 3 de *Neurospora* durante la segunda división meiótica. Indique el contenido de cada una de las ocho ascosporas en relación con este cromosoma.

b. Normalmente *Neurospora* tiene 7 cromosomas. ¿Cuántos cromosomas hay en cada una de las ascosporas del asco del apartado a?

4. a. ¿Cómo construiría un pentaploide (5*x*)?

b. ¿Cómo construiría un triploide (3*x*) de genotipo *A/a*...

c. Acaba de obtener una mutación recesiva a^* poco co... en una planta diploide que por análisis mendeliano deduc... que es A/a^*. ¿Cómo construiría un tetraploide (4*x*) $A/A/a^*/a^*$...

d. ¿Cómo construiría un tetraploide de genotipo *A/a/a/a*?

e. ¿Cómo construiría una planta que fuera resistente a un herbicida químico? (Suponga que esta mutación es muy poco frecuente.)

5. ¿Cuál de los siguientes apartados completa correctamente la frase? Los alopoliploides son: **(a)** completamente estériles; **(b)** fértiles sólo entre ellos; **(c)** fértiles únicamente con uno de los parentales; **(d)** fértiles sólo con ambos parentales; **(e)** fértiles sólo con ambos parentales y entre sí.

6. Se pueden conseguir células de levadura tetraploides mediante la fusión de dos células diploides. Estos tetraploides sufren meiosis como cualquier otro tetraploide y producen cuatro productos meióticos diploides. Asumiendo que los cromosomas homólogos aparean al azar y que no ocurre recombinación en el intervalo entre el gen y el centrómero, ¿qué tétradas desordenadas produciría un tetraploide de genotipo *B/B/b/b*? ¿Cuáles serían las frecuencias de los distintos tipos de ascas? (**Nota:** esta pregunta requiere análisis de tétradas con células tetraploides, en lugar de las células diploides normales.)

7. Considere un tetraploide de genotipo *A/A/a/a* en el que no se produce apareamiento entre cromosomas de un mismo parental. En otro tetraploide de genotipo *B/B/b/b*, los pares se forman sólo entre cromosomas del mismo parental. ¿Qué proporciones fenotípicas se esperarían tras la autofecundación en cada uno de los casos? (Asuma que en cada caso un parental es portador del alelo dominante y el otro del alelo recesivo).

8. En el género *Triticum*, hay muchas especies poliploides y diploides distintas. Se llevaron a cabo cruzamientos entre diferentes especies, obteniéndose híbridos. Se observó el apareamiento meiótico en cada híbrido, resultado que se recoge en el Cuadro siguiente. (Un bivalente resulta del apareamiento meiótico de dos cromosomas homólogos y un univalente es un cromosoma no apareado en la meiosis.)

Especies cruzadas para obtener híbridos	Apareamiento en el híbrido
T. turgidum × × T. *monococcum*	7 bivalentes + 7 univalentes
T. aestivum × × *T. monococcum*	7 bivalentes + 14 univalentes
T. aestivum × × *T. turgidum*	14 bivalentes + 7 univalentes

Explique estos resultados y

a. deduzca el número de cromosomas somáticos en cada una de las especies utilizadas.

b. especifique qué especies son poliploides y si son auto o alopoliploides.

c. describa el patrón de apareamiento cromosómico en los tres híbridos.

9. La especie de algodón del Nuevo Mundo *Gossypium hirsutum* tiene un número cromosómico $2n$ de 52. Las especies del Viejo Mundo *G. thurberi* y *G. herbaceum* tienen cada una un número $2n$ de 26. Los híbridos entre estas especies muestran las siguientes configuraciones durante el apareamiento meiótico:

Híbridos	Configuración durante el apareamiento
G. hirsutum × × *G. thurberi*	13 bivalentes pequeños + + 13 univalentes grandes
G. hirsutum × × *G. herbaceum*	13 bivalentes grandes + + 13 univalentes pequeños
G. thurberi × × *G. herbaceum*	13 univalentes grandes + + 13 univalentes pequeños

Dibuje diagramas que permitan interpretar filogenéticamente estas observaciones, indicando claramente la relación entre las especies. ¿Cómo demostraría que su interpretación es correcta? (El problema 9 es de A. M. Srb, R. D. Owen y R. S. Edgar, *General Genetics*, 2nd. Copyright © 1965 de W. H. Freeman and Company.)

10. El genotipo de un autotetraploide heterocigótico para dos loci es *F/F/f/f* ; *G/G/g/g*. Cada locus afecta a un carácter distinto y los dos loci se localizan muy próximos al centrómero en cromosomas diferentes (no homólogos).

a. ¿Qué genotipos gaméticos produce este individuo y en qué proporciones?

b. Si el individuo se autofecunda, ¿qué proporción de la descendencia tendrá el genotipo *F/F/F/f* ; *G/G/g/g*? ¿y el genotipo *f/f/f/f* ; *g/g/g/g*?

11. ¿Cuáles de los siguientes síndromes *no* están producidos por fenómenos de no disyunción meiótica? **(a)** Síndrome de Turner; **(b)** síndrome *cri du chat*; **(c)** síndrome de Down; **(d)** síndrome de Klinefelter; **(e)** síndrome XYY; **(f)** enanismo acondroplásico; **(g)** síndrome de Edwards; **(h)** síndrome de Marfan.

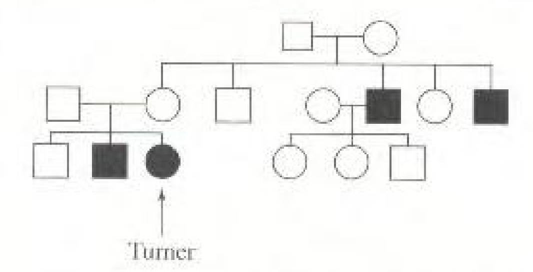
12. Se descubre que una paciente afectada por el síndrome de Turner presenta también ceguera para los colores. Tanto su padre como su madre tienen una visión normal. ¿Cómo podría ser explicada su ceguera? ¿Revela este resultado si la falta de disyunción ocurrió en el padre o en la madre? Si el gen que confiere ceguera para los colores estuviera situado cerca del centrómero (en la realidad, no lo está), ¿nos indicarían los datos clínicos si la no disyunción ocurrió en la primera o la segunda división meiótica? Repita la respuesta para un paciente ciego para los colores con síndrome de Klinefelter.

13. Se han encontrado individuos ciegos para los colores en un ojo pero no en el otro. ¿Qué nos sugeriría esto si los individuos mencionados fueran: **(a)** sólo o mayoritariamente mujeres?; **(b)** sólo o mayoritariamente varones? (Suponga que se trata de un carácter recesivo ligado al sexo.)

14. Cuando se tratan espermatozoides humanos con clorhidatro de quinacrina, alrededor de la mitad de las células

muestran una zona fluorescente que se cree es el cromosoma Y. Aproximadamente el 1.2 % de los espermatozoides presentan dos zonas fluorescentes. Se examinaron los espermatozoides de algunos trabajadores industriales expuestos durante un período de un año al producto químico dibromocloropropano, y la frecuencia media de espermatozoides con dos zonas fue del 3.8 %. Proponga una explicación para estos resultados y explique cómo la comprobaría.

15. Se determina que un paciente con síndrome de Turner presenta además el fenotipo nistagmo (un desorden ocular).



a. ¿Qué fenómeno o fenómenos permitirían explicar la coincidencia entre las dos condiciones hereditarias?

b. ¿En qué parental y en qué estadio ocurrió el fenómeno o fenómenos?

16. En la Columbia Británica, la edad media de las madres de bebés con el síndrome de Down descendió de 34 a 28 años entre 1952 y 1972. ¿Cuáles podrían ser las posibles causas de este descenso y cómo podrían demostrarse las dos hipótesis relacionadas?

17. En la especie humana existen varios tipos de mosaicos sexuales bien documentados. Aporte sugerencias sobre cómo podrían haberse producido los siguientes ejemplos:

a. (XX) (XO) (es decir, hay dos tipos celulares en el cuerpo, XX y XO).

b. (XX) (XXYY) **c.** (XO) (XXX)

d. (XX) (XY) **e.** (XO) (XX) (XXX)

18. El descubrimiento de los patrones de bandas en los cromosomas eucarióticos ha permitido mejorar ostensiblemente la capacidad de identificar diversos sucesos a nivel citológico. Los polimorfismos en las bandas son particularmente útiles, porque los «morfos» pueden emplearse como marcadores cromosómicos. Estos «morfos» hacen a los cromosomas citológicamente distinguibles en virtud de ligeras variaciones en el tamaño de las bandas, de su posición, etc. Consideremos el cromosoma 21 humano. Suponga que tenemos unos padres que son 21^a21^b ♀ × 21^c21^d ♂ donde a, b, c y d representan morfos de un polimorfismo para este cromosoma. Suponga también que se producen fetos de los siguientes tipos (donde 42A representan los restantes autosomas):

1. $42A + 21^b21^b21^c + XY$

2. $42A + 21^a21^b21^d + XX$

3. $42A + 21^b21^d + XY$

4. $42A + 21^a21^c21^c + XX$

5. $42A + 21^a21^b + XY$

6. $42A + 21^a21^c + XYY$

7. $(42A + 21^a + XY)(42A + 21^a21^c21^c + XY)$ (mosaico)

8. $(42A + 21^a21^c + XY)(42A + 21^a21^d + XX)$ (mosaico)

En cada caso:

a. Indique el término genético aplicable.

b. Haga un diagrama de los sucesos que lo produjeron.

c. Señale en qué individuo tuvo lugar.

19. Suponga que tiene una línea de ratones que presenta distintas formas citológicas del cromosoma 4. El extremo del cromosoma puede tener un engrosamiento (denominado 4^K), un satélite (denominado 4^S) o no presentar ninguna de estas estructuras (4). A continuación se representan esquemas de los tres tipos:



Realiza un cruzamiento entre una hembra $4^K 4^S$ y un macho 4 4, y observa que aparecen los descendientes $4^K 4$ y 4^S 4 esperados. Sin embargo, ocasionalmente, aparecen algunos individuos raros, como se indica a continuación (todos los otros cromosomas son normales):

a. $4^K 4^K 4$ **b.** $4^K 4^S 4$ **c.** 4^K

d. mosaico $4/4^K 4^K 4$ **e.** mosaico $4^K 4/4^S 4$

Dé una explicación a estos tipos de individuos. Indique con tanta precisión como le sea posible, los estadios en los que se originaron, e indique también si los fenómenos ocurrieron en el parental macho, en el parental hembra o en el cigoto. (Razone brevemente sus respuestas.)

20. En *Drosophila*, se realiza un cruzamiento (cruzamiento 1) entre dos moscas mutantes, una homocigótica para la mutación recesiva *b* (ala curvada) y la otra homocigótica para la mutación recesiva *e* (sin ojos). Las mutaciones *b* y *e* son alelos de dos genes distintos que sabemos están situados en el pequeño cromosoma 4, estrechamente ligados entre sí. Toda la descendencia presentó fenotipo silvestre. Una de las hembras descendientes se cruzó con un macho *b e/b e* (llámelo cruzamiento 2). La mayoría de los descendientes de este segundo cruzamiento era de los tipos esperados, pero apareció también una hembra rara de fenotipo silvestre.

a. Explique cuál era la descendencia esperada del cruzamiento 2.

b. ¿Pudo aparecer la hembra silvestre por (1) entrecruzamiento o (2) no disyunción? Explíquelo.

c. La hembra rara se utilizó en un cruzamiento de prueba con un macho de genotipo *b e/b e* (cruzamiento 3). La descendencia fue:

$\frac{1}{6}$ silvestres
$\frac{1}{6}$ alas curvadas, sin ojos
$\frac{1}{3}$ alas curvadas
$\frac{1}{3}$ sin ojos

¿Cuál de sus explicaciones del apartado b son compatibles con este resultado? Explique los genotipos y fenotipos de los descendientes del cruzamiento 3 y sus proporciones.

El problema paso a paso

1. Defina homocigótico, mutación, alelo, estrechamente ligado, recesivo, silvestre, entrecruzamiento, no disyunción, cruzamiento de prueba, fenotipo y genotipo.

2. ¿Implica este problema ligamiento al sexo? Explíquelo.

3. ¿Cuántos cromosomas tiene *Drosophila*?

4. Dibuje un pedigrí claro que resuma los resultados de los cruzamientos 1, 2 y 3.

5. Dibuje los gametos producidos por los dos parentales en el cruzamiento 1.

6. Dibuje la constitución del cromosoma 4 en la descendencia del cruzamiento 1.

7. ¿Es sorprendente que la descendencia del cruzamiento 1 tenga fenotipo silvestre? ¿Qué le sugiere este hecho?

8. Dibuje la constitución del cromosoma 4 del macho de prueba utilizado en el cruzamiento 2 y los gametos que puede producir.

9. En relación con el cromosoma 4, ¿qué gametos puede producir el parental femenino del cruzamiento 2 en ausencia de no disyunción? ¿Cuáles serían comunes y cuáles raros?

10. Dibuje la no disyunción en la primera y la segunda división meiótica en el parental hembra del cruzamiento 2, así como los gametos resultantes.

11. ¿Es aneuploide alguno de los gametos del apartado anterior?

12. ¿Esperaría que los gametos aneuploides dieran lugar a descendencia viable? ¿Sería esa descendencia nulisómica, monosómica, disómica o trisómica?

13. ¿Qué fenotipos presentaría la descendencia producida por los gametos considerados en los apartados 9 y 10?

14. Considere la proporción fenotípica en la descendencia del cruzamiento 3. Muchas proporciones genéticas se basan en mitades y cuartos, pero esta proporción se basa en tercios y sextos. ¿Qué podría estar indicando esto?

15. ¿Podría haber algún significado en el hecho de que los cruzamientos impliquen genes situados en un cromosoma muy pequeño? ¿Cuándo es el tamaño de un cromosoma relevante en Genética?

16. Dibuje la descendencia esperada del cruzamiento 3 bajo las dos hipótesis y dé alguna idea de las proporciones relativas.

21. Se realiza un cruzamiento entre una planta de tomate trisómica para el cromosoma 6, utilizada como hembra, y una planta diploide normal y homocigótica para un alelo recesivo que produce hojas semejantes a las de la patata (*p/p*), que se utiliza como donante de polen.

a. Se realiza un cruzamiento de prueba entre una planta trisómica de la F_1 y la planta donante de polen de hojas semejantes a las de la patata. Si suponemos que *p* está situado en el cromosoma 6, ¿qué proporción esperaría de plantas normales y plantas con hojas semejantes a las de la patata?

b. Si suponemos que *p* no está en el cromosoma 6, ¿cuál es la proporción esperada de plantas normales y plantas con hojas semejantes a las de la patata?

22. Un genetista que trabaja con plantas de tomate intentó asignar cinco alelos recesivos a cromosomas concretos utilizando trisómicos. Cada mutante homocigótico ($2n$) se cruzó con tres trisómicos para los cromosomas 1, 7 y 10. De estos cruzamientos, se seleccionó la descendencia trisómica (menos vigorosa). Esta descendencia trisómica se retrocruzó con el homocigoto recesivo adecuado. Se examinó la descendencia *diploide* de estos cruzamientos, observándose los siguientes resultados, donde las proporciones son silvestre : mutante.

Cromosoma trisómico	GEN				
	d	*y*	*c*	*h*	*cot*
1	48:55	72:29	56:50	53:54	32:28
7	52:56	52:48	52:51	58:56	81:40
10	45:42	36:33	28:32	96:50	20:17

¿Qué genes pueden localizarse y a qué cromosomas se asignarían? (Dé una explicación detallada de su respuesta.)

23. Las plantas de *Petunia* tienen cuatro loci *A*, *B*, *C* y *D*, que están estrechamente ligados. Se irradia con rayos gamma una planta de genotipo *a B c D/A b C d*, y a continuación se cruza con *a b c d/a b c d*. Entre la descendencia, son frecuentes las plantas de genotipo *A B C D*. ¿Cuáles serían dos posibles modos de origen y cuál es el más probable?

24. Un cruzamiento entre una estirpe de *Neurospora* portadora de un cromosoma con los marcadores múltiples $a\ b^+\ c\ d^+\ e$ y otra con los marcadores $a^+\ b\ c^+\ d\ e^+$ da lugar a un producto meiótico que crece en medio mínimo. (Asuma que *a*, *b*, *c*, *d* y *e* son marcadores de auxotrofía). Cuando esta colonia extraña crece, algunas esporas *asexuales* son de genotipo $a\ b^+\ c\ d^+\ e$, otras son $a^+\ b\ c^+\ d\ e^+$ y las restantes crecen en medio mínimo. Explique el origen del producto meiótico raro y el origen de los tres tipos de esporas asexuales.

25. Se cruzan dos auxótrofos de *Neurospora*: *pan1* × *leu2*. Estos loci están ligados en el mismo brazo cromosómico, estando *leu2* entre el centrómero y *pan1*. La mayor parte de óctadas de este cruzamiento fueron del tipo esperado, pero se obtuvieron también los siguientes tipos no esperados:

a.	**b.**
Completamente protótrofo	Auxótrofo para pan
Completamente protótrofo	Auxótrofo para pan
Completamente protótrofo	Aborto
Completamente protótrofo	Aborto
Aborto	Auxótrofo para Leu
Aborto	Auxótrofo para Leu
Aborto	Auxótrofo para Leu
Aborto	Auxótrofo para Leu

c. Completamente protótrofo
Completamente protótrofo
Aborto
Aborto
Auxótrofo para Leu
Auxótrofo para Leu
Auxótrofo para pan
Auxótrofo para pan

Explique estos tres tipos de óctadas.

***26.** El ascomiceto *Sordaria brevicollis* tiene dos marcadores estrechamente ligados, b_1 y b_2, que complementan y dan lugar a ascosporas de color marrón claro. En el cruzamiento $b_1 \times b_2$, si uno o ambos centrómeros se dividen y separan antes de tiempo en la primera división meiótica, ¿qué patrones de color de esporas presentarán esas ascas? ¿Cómo distinguiría estas ascas de las normales y de ascas en las cuales hubiera ocurrido un fenómeno de no disyunción? (**Nota**: en este hongo, las ascosporas normales son negras, y las ascosporas nulisómicas son blancas; asuma que no hay recombinación entre b_1 y b_2.)

27. Diseñe un sistema para la detección de agentes ambientales que sean potencialmente capaces de provocar aneuploidía en los eucariotas.

28. Dos alelos determinan el color de las flores de la planta *Datura*: *P* determina el púrpura y *p* el blanco. El locus *P* está en el cromosoma más pequeño, el número 3. En las plantas trisómicas para este cromosoma, el polen de $n + 1$ nunca es funcional, sólo la mitad de los huevos $n + 1$ lo son. Suponga que *P* es siempre completamente dominante para cualquier número de *p*, y que el locus está junto al centrómero. ¿Cuál sería la proporción púrpura: blanco esperada en la descendencia de los siguientes cruzamientos?

a. *P/P/p* ♀ × *P/P/p* ♂

b. *P/p/p* ♀ × *P/p/p* ♂

c. *P/p/p* ♀ × *p/p* ♂

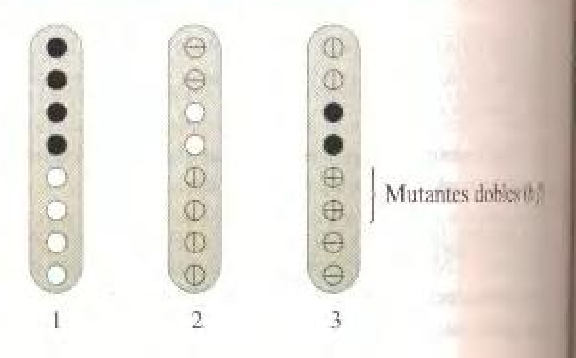
29. Existen seis especies principales del género *Brassica*: *B. carinata*, *B. campestris*, *B. nigra*, *B. oleracea*, *B. juncea* y *B. napus*. Las relaciones entre las seis especies pueden deducirse a partir de la siguiente tabla:

a. Deduzca el número de cromosomas de *B. campestris*, *B. nigra* y *B. oleracea*.

b. Indique claramente cualquier relación evolutiva entre las seis especies que pueda deducir a nivel cromosómico.

Especie o híbrido F_1	Número de cromosomas	Número de bivalentes	Número de univalentes
B. juncea	36	18	0
B. carinata	34	17	0
B. napus	38	19	0
B. juncea × *B. nigra*	26	8	10
B. napus × *B. campestris*	29	10	9
B. carinata × *B. oleracea*	26	9	8
B. juncea × *B. oleracea*	27	0	27
B. carinata × *B. campestris*	27	0	27
B. napus × *B. nigra*	27	0	27

30. En el hongo *Ascobolus* (similar a *Neurospora*), las ascosporas son normalmente negras. La mutación *f*, que da lugar a ascosporas de color crema, está localizada en un gen situado a la derecha del centrómero del cromosoma 6, mientras que la mutación *b*, que produce ascosporas de color beige, está en un gen situado justo a la izquierda del mismo centrómero. En un cruzamiento entre parentales crema y beige (+ *f* × *b* +), la mayoría de las óctadas muestran cuatro ascosporas crema y cuatro beige, pero aparecen óctadas excepcionales raras, como las que se muestran en el esquema adjunto. En este esquema, el color negro indica el fenotipo silvestre, una línea vertical indica el fenotipo crema, una línea horizontal indica el fenotipo beige y un círculo vacío indica una espora abortada (muerta).



a. Ofrezca explicaciones razonables para estas tres óctadas excepcionales.

b. Haga un esquema de la meiosis que produjo la óctada 2.

31. El ciclo de vida del hongo haploide *Ascobolus* es similar al de *Neurospora*. En una mutagénesis se obtuvieron dos líneas mutantes, 1 y 2, que cuando se cruzaron con el silvestre dieron lugar a tétradas desordenadas, todas del siguiente tipo (el color crema es marrón claro; normalmente, los cruzamientos producen ascosporas todas de color negro):

Par de esporas 1	negro
Par de esporas 2	negro
Par de esporas 3	crema
Par de esporas 4	crema

a. ¿Qué muestran estos resultados? Explíquelo.

Se cruzaron las dos líneas mutantes. La mayoría de las tétradas desordenadas fueron del siguiente tipo:

Par de esporas 1	crema
Par de esporas 2	crema
Par de esporas 3	crema
Par de esporas 4	crema

b. ¿Qué sugiere este resultado? Explíquelo.

Cuando se realizó el escrutinio de un número elevado de tétradas desordenadas bajo el microscopio, se encontraron algunas raras que contenían esporas negras. A continuación se muestran cuatro casos:

	Caso A	Caso B	Caso C	Caso D
Par de esporas 1	negro	negro	negro	negro
Par de esporas 2	negro	crema	negro	aborto
Par de esporas 3	crema	crema	aborto	crema
Par de esporas 4	crema	crema	aborto	crema

(**Nota**: las ascosporas con material genético extra sobreviven, pero aquéllas con una cantidad menor que la del genoma haploide, abortan.)

c. Proponga explicaciones genéticas razonables para cada uno de estos cuatro casos raros.

d. ¿Piensa que las mutaciones en las dos líneas mutantes originales ocurrieron en un mismo gen? Explíquelo.

32. En cierta planta tropical hay dos genes, cada uno de los cuales produce un color de pigmento. Los loci *R* (color rojo; $R > r$) y *B* (color azul; $B > b$) están ligados al centrómero en distintos cromosomas. Se obtuvieron plantas tetraploides en las cuales los cromosomas emparejaban dos a dos en la meiosis. Se realizó el siguiente cruzamiento:

$$R/R/R/R\ ;\ b/b/b/b \quad \times \quad r/r/r/r\ ;\ B/B/B/B$$

y se obtuvo la F_1 que se autopolinizó para dar lugar a la F_2. Si sólo es necesario un alelo dominante para dar lugar al fenotipo dominante en cada locus, ¿qué fenotipos se esperan en la F_2 y en qué proporciones?

33. Una genetista investigadora del tomate centra sus estudios en *Fr*, un alelo mutante dominante que provoca la maduración rápida del fruto. Decide encontrar qué cromosoma contiene este gen utilizando un número de líneas que son trisómicas para un único cromosoma. Para ello, cruza un mutante diploide homocigótico con cada una de las líneas trisómicas silvestres.

a. Se cruza una planta F_1 trisómica con una planta diploide silvestre. ¿Cuál es la proporción de plantas de maduración rápida y lenta en la descendencia *diploide* de este segundo cruce si *Fr* está en el cromosoma trisómico? Utilice diagramas para explicarlo.

b. ¿Cuál es la proporción de plantas de maduración rápida y lenta en la descendencia *diploide* de este segundo cruce si *Fr* no está en el cromosoma trisómico? Utilice diagramas para explicarlo.

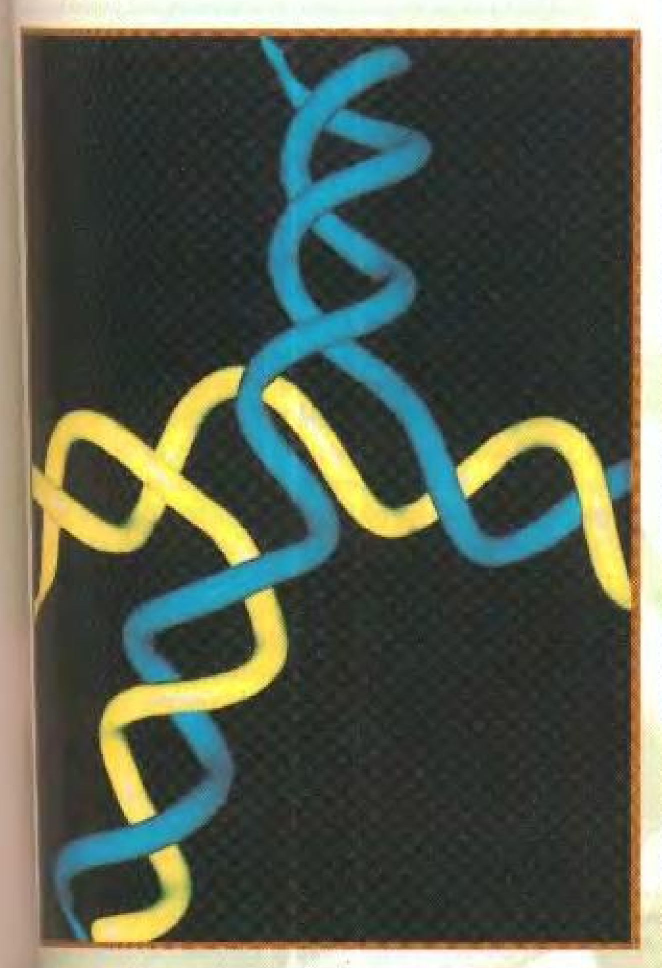
c. A continuación, se detallan los resultados de los cruzamientos. ¿En qué cromosoma está *Fr* y por qué?

Cromosoma trisómico	Maduración rápida: en la descendencia diploide
1	45:47
2	33:34
3	55:52
4	26:30
5	31:32
6	37:41
7	44:79
8	49:53
9	34:34
10	37:39

(Problema 33 de Tamara Western.)

19

MECANISMOS DE LA RECOMBINACIÓN



odelo simulado por ordenador del sitio de intercambio.
Wcsdal, Computer Graphics Laboratory, University of California, San Francisco. ...Regents, University of California.)

Ideas fundamentales

La recombinación se produce entre las regiones homólogas de los cromosomas, mediante rotura y nueva unión de las moléculas de DNA.

Los modelos que explican la recombinación, como el de Holliday, implican la formación de un punto de intersección heterodúplice, que puede desplazarse, y la posterior resolución de esta estructura de transición para dar lugar a diferentes tipos de moléculas de DNA recombinante.

Los modelos de recombinación permiten explicar los resultados de los cruzamientos genéticos.

Se han identificado muchas de las enzimas que participan en la recombinación en bacterias.

Durante nuestros análisis del ligamiento estudiamos la recombinación de los genes por entrecruzamiento. En este capítulo, trataremos los mecanismos moleculares que la producen. La Figura 19-1 representa un hecho básico de entrecruzamiento, en el que las dos moléculas homólogas quedan alineadas y, a continuación, sufren recombinación. Cuando el trabajo de Benzer y el de otros investigadores reveló que se producía recombinación en el interior de los genes, resultó evidente que ésta debía ser muy precisa, ya que incluso errores de un único par de bases podían desorganizar la integridad del gen. ¿Cómo pueden ser tan precisos el reconocimiento de los cromosomas homólogos y los hechos de recombinación? La respuesta radica en el poder de la complementariedad entre las bases. Veremos de qué forma la complementariedad entre las bases y la formación de regiones heterodúplices entre las zonas compl mentarias de los cromosomas homólogos conduce a los hech de recombinación que hemos estudiado.

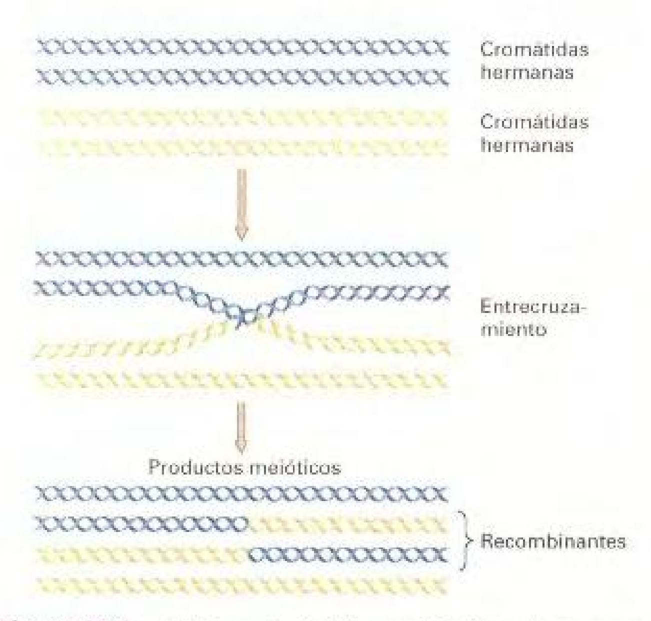


Figura 19-1. El hecho molecular de la recombinación puede representarse esquemáticamente mediante dos moléculas de doble cadena que se rompen y se vuelven a unir.

Rotura y nueva unión de las moléculas de DNA

Los experimentos relatados en el Capítulo 5 proporcionan u evidencia *indirecta* de la existencia de rotura y nueva unión d las moléculas de DNA. Una de las primeras pruebas *directas* d que los cromosomas (en este caso, los cromosomas virales) s pueden romper y volverse a unir procede de experimentos con fago λ realizados por Matthew Meselson y Jean Weigle en 196 Infectaron *E. coli* de forma simultánea con dos estirpes de λ Una estirpe, que contenía los marcadores genéticos *c* y *mi* e uno de los extremos del cromosoma, era «pesada» debido a q los fagos se habían obtenido sobre células incubadas en presen cia de los isótopos pesados del carbono (C^{13}) y del nitróge (N^{15}). La otra estirpe era c^+ mi^+ para los marcadores y te DNA «ligero», puesto que los fagos se habían recogido a part de células incubadas con los isótopos ligeros normales C^{12} y N^{14} Los dos DNA (cromosomas) pueden representarse como se ilu tra en la Figura 19-2*a*. Las células infectadas con los dos tipos de fagos se incubaron en medio ligero hasta que se lisaron.

Los fagos descendientes liberados de las células se centrifuga ron en un gradiente de densidad de cloruro de cesio. Se obtu una banda ancha, que indicaba que las densidades de los DNA víricos variaban desde el valor del parental pesado hasta el de parental ligero, con muchas densidades intermedias (Fig. 19-2b Resultó de especial interés la recuperación de algunos fagos re combinantes cuyas densidades eran muy próximas a las del pa rental pesado. Estos presentaban el genotipo *c* mi^+, y debían ha berse producido por un intercambio entre los dos marcador (Fig. 19-2*c*). Era de esperar la alta densidad de su cromosoma ya que sólo el pequeño fragmento del extremo del cromosoma

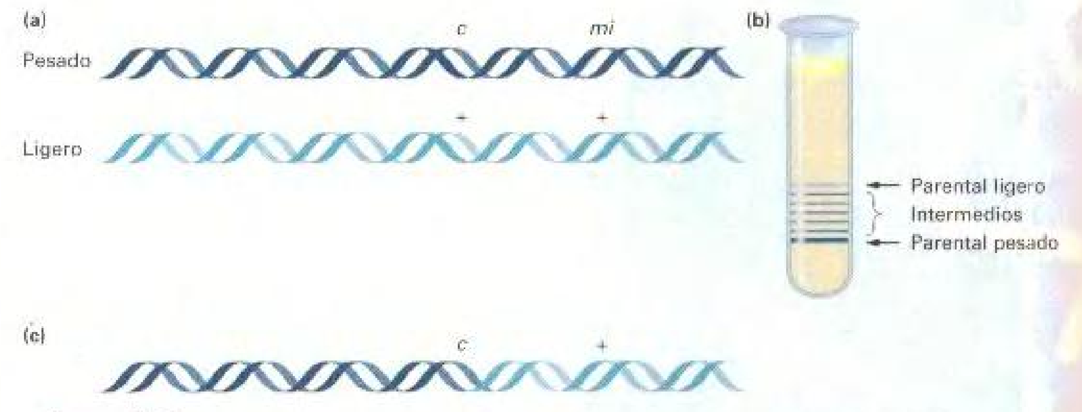


Figura 19-2. Pruebas de la existencia de rotura y nueva unión en los cromosomas de fagos λ. (a) Se utilizan los cromosomas de dos estirpes de λ para infectar simultáneamente a *E. coli*. (b) Bandas producidas al centrifugar la descendencia de fagos en un gradiente de densidad de cloruro de cesio. El hecho de que se obtengan bandas de densidades intermedias indica la existencia de una gama de cromosomas con componentes parcialmente ligeros y parcialmente pesados. (c) Cromosoma de la descendencia pesada que resulta de un entrecruzamiento entre los dos marcadores. La densidad de este producto recombinante confirma que el entrecruzamiento implica la rotura física del DNA y la posterior unión de las cadenas.

con el alelo mi^+ provenía del parental ligero. En el cruzamiento recíproco de fagos pesados c^+ mi^+ con fagos ligeros c mi, los recombinantes pesados fueron c^+ mi, tal y como se esperaba. Estos resultados sólo se pueden explicar de una manera: el hecho de recombinación debe haber ocurrido mediante rotura y nueva unión del DNA. Aunque debemos ser precavidos a la hora de extrapolar lo que ocurre en los cromosomas víricos a lo que sucede en los eucarióticos, este experimento demuestra que la rotura y nueva unión de las cadenas de DNA es algo que realmente tiene lugar.

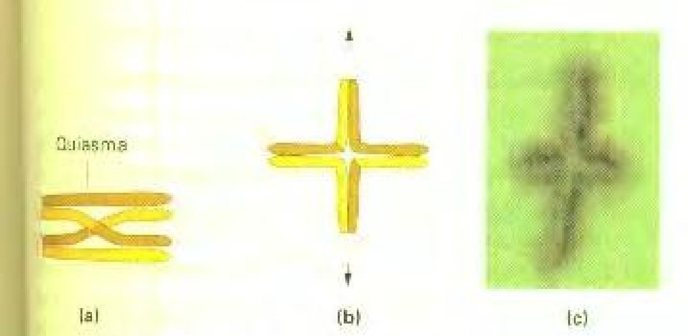


Figura 19-3. Entrecruzamiento entre cromátidas no hermanas teñidas de oscuro y de claro en una meiosis de langosta. (a) Representación del quiasma. (b) El mejor momento para observarlo es cuando los centrómeros (óvalos blancos) se han separado levemente, formando una estructura cruciforme con el quiasma en el centro. (c) Fotografía del estadio mostrado en la parte b. (Fotografía cortesía de C. Tease y G. H. Jones. *Cromosoma* 69, 1978, 163-178.)

Quiasmas: los sitios de entrecruzamiento

En el Capítulo 5, dimos por hecho que los quiasmas son los sitios por donde realmente se producen los entrecruzamientos. Los análisis de cartografía genética apoyan indirectamente esta idea: puesto que una media de un entrecruzamiento por meiosis corresponde a 50 unidades de mapa genético, debería haber correlación entre el tamaño del mapa genético de un cromosoma y el número medio de quiasmas observados por meiosis. Esta correlación se ha comprobado en organismos bien caracterizados genéticamente.

La técnica de tinción que produce cromosomas en arlequín (véase el Cap. 8) ha permitido verificar directamente esta idea. En 1978, C. Tease y G. H. Jones, trabajando con langostas, prepararon cromosomas meióticos en arlequín. Recuerde que esta técnica produce cromátidas hermanas distinguibles, una oscura y otra clara. Cuando tiene lugar un entrecruzamiento, puede implicar a dos cromátidas no hermanas oscuras, a dos claras o a una clara y la otra oscura, como se muestra en la Figura 8-16. Esta última situación es decisiva, ya que origina cromátidas entrecruzadas mixtas (con parte oscura y parte clara). Tease y Jones observaron que la transición oscuro-claro tiene lugar exactamente en el quiasma —demostrando que los quiasmas son los sitios en los que se producen los entrecruzamientos y resolviendo una cuestión que estaba pendiente desde el comienzo del siglo XX (Fig. 19-3).

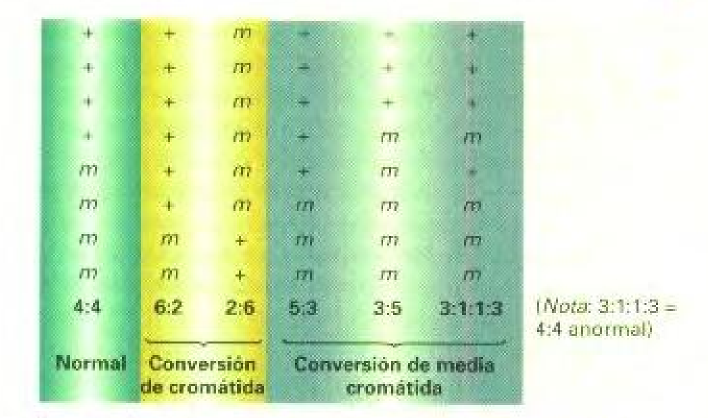


Figura 19-4. Proporciones anormales raras de alelos observadas en un cruzamiento en hongos del tipo + × *m*. (En la figura se representan los genotipos de las ascas). Cuando no se obtiene la segregación mendeliana 4:4, algunos de los alelos implicados en el cruzamiento se han convertido en los alelos opuestos. En ciertas ascas, parece que se ha convertido la cromátida completa (segregaciones 6:2 ó 2:6). En otras, parece que sólo se ha convertido media cromátida (segregaciones 5:3, 3:5 ó 3:1:1:3.)

Resultados genéticos que llevaron a los modelos de recombinación

El análisis de tétradas en hongos filamentosos, como *Neurospora crassa*, en los que se pueden recuperar y analizar los cuatro productos de una sola meiosis (véase el Cap. 6), proporcionó el impulso que derivó en los primeros modelos para la recombinación intragénica. Estos decisivos hallazgos, que revisaremos a continuación, fueron la conversión génica, la evidencia de segregación posmeiótica de los hechos de conversión génica, la polaridad y la asociación entre la conversión génica y el entrecruzamiento.

1. *Conversión génica.* En algunas ascas (0.1-1.0 % en los hongos filamentosos, que incrementa hasta 4 % en levadu-

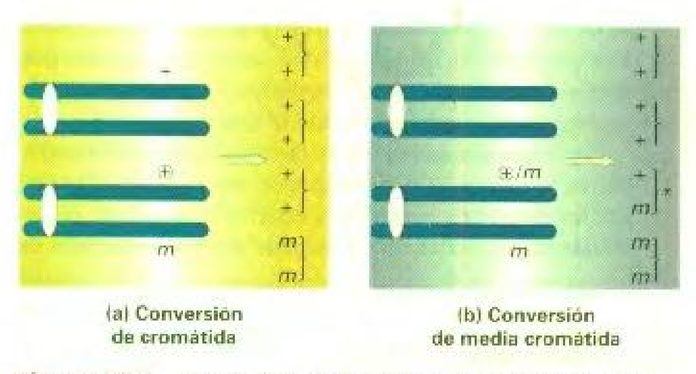


Figura 19-5. La conversión génica se infiere de los patrones de alelos observados en las ascas. (a) En una conversión de cromátida, el alelo de una de las cromátidas parece haberse convertido de alguna forma en un alelo como el situado en la otra cromátida. El alelo convertido se muestra con el símbolo ⊕. Una pareja de esporas muestra el genotipo opuesto al esperado de la segregación mendeliana. (b) En una conversión de media cromátida, una pareja de esporas (*) tiene alelos no idénticos. De alguna forma, parece haberse convertido la mitad de una cromátida, dando lugar a una espora con el genotipo original y una espora convertida en el otro alelo.

ras), se detectan desviaciones de las proporciones alélicas 4:4 características de la segregación mendeliana. La Figura 19-4 muestra las proporciones anormales más frecuentes. Parece como si, durante el cruzamiento, algunos alelos se hubiesen «convertido» en los alelos opuestos (Fig. 19-5). Por dicha razón, el proceso se conoce como **conversión génica**; sólo ocurre cuando hay heterocigosis para dos alelos distintos de un gen. En las ascas con segregación 6:2 ó 2:6, parece que se ha convertido una cromátida completa de un cromosoma. En las ascas con segregación 5:3 ó 3:5, parece que se ha convertido sólo la mitad de la cromátida. En este caso, los dos miembros de una pareja de esporas tienen genotipos distintos. Recuerde que cada pareja de esporas se origina por mitosis a partir de un único producto de la meiosis. Las segregaciones 5:3 ó 3:5 se pueden explicar únicamente porque las dos cadenas de la doble hélice llevan la información de dos alelos distintos a la conclusión de la meiosis. Por lo tanto, la siguiente división mitótica da lugar a la segregación posmeiótica de los alelos.

La conversión no se puede explicar por mutación, puesto que el alelo que es convertido siempre cambia hacia el otro alelo concreto que *toma parte en el cruzamiento*, y nunca hacia algún otro alelo del locus que no participe en el cruzamiento.

2. *Polaridad.* En genes para los que se dispone de un mapa alélico preciso, podemos comparar las frecuencias de conversión de alelos situados en varias posiciones dentro del gen. En casi todos los casos, los sitios más cercanos a un extremo muestran frecuencias mayores que los sitios más alejados de ese extremo. En otras palabras, hay un gradiente o polaridad en las frecuencias de conversión a lo largo del gen (Fig. 19-6).

3. *Conversión y entrecruzamiento.* En cruzamientos heteroalélicos en los que el locus estudiado está flanqueado por otros dos marcadores genéticos muy próximos, la conversión suele ir acompañada (alrededor del 50 % de las veces) de un entrecruzamiento en una de las regiones flanqueantes. Este intercambio tiene lugar casi siempre en el lado más próximo al alelo que se ha convertido y suele implicar a la cromátida en la que ha ocurrido la conversión.

Consideremos, por ejemplo, las cromátidas esquematizadas en la Figura 19-6. Supongamos que la polaridad es tal que los alelos más próximos al extremo izquierdo de la cromátida se convierten más a menudo que los localizados en el extremo derecho. El cruzamiento representado se realiza entre $a^+ \ m_2 \ b^+$ y $a \ m_1 \ b$, donde m_1 y m_2 son alelos distintos del locus *m*, mientras que *a* y *b* representan marcadores flanqueantes próximos. Si analizamos las ascas en las que la conversión ha ocurrido en el sitio m_1 (el tipo de conversión más frecuente en este locus), encontraremos que en la mitad de estas ascas habrá ocurrido también un entrecruzamiento en la región I y en la otra mitad no habrá sucedido. En las ascas, menos numerosas, en las que la conversión génica ha ocurrido en el sitio m_2, la mitad tendrá también un entrecruzamiento en la región II y la otra mitad no tendrá entrecruzamiento. Estos sucesos se detectan en ascas de genotipos como los mostrados en la Figura 19-7, que pueden interpretarse como una conversión de $m_1 \rightarrow +$, acompañada por un entrecruzamiento en la región I.

En algunas ascas, un solo hecho de conversión parece incluir varios sitios a la vez. En un cruzamiento heteroalélico, este suceso se denomina **co-conversión** (Fig. 19-8). La frecuencia de co-conversión aumenta conforme la distancia entre los alelos disminuye.



Figura 19-6. Esquema de las cromátidas implicadas en un cruzamiento, mostrándose las regiones I y II de un gen. La flecha indica la polaridad de la conversión génica en el locus *m*, apuntando hacia el extremo con menor frecuencia de conversión génica.

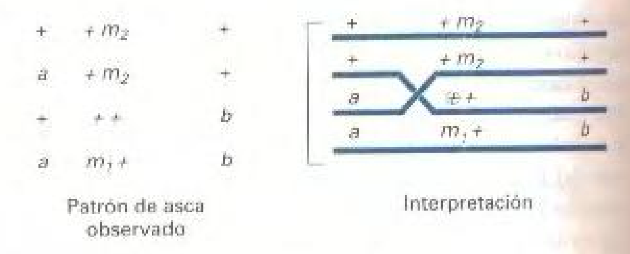


Figura 19-7. Un patrón concreto de asca se puede explicar por entrecruzamiento y conversión de cromátida. En este caso, se ha producido una conversión de $m_1 \rightarrow +$ asociada a un entrecruzamiento en la región entre *a* y *x*.

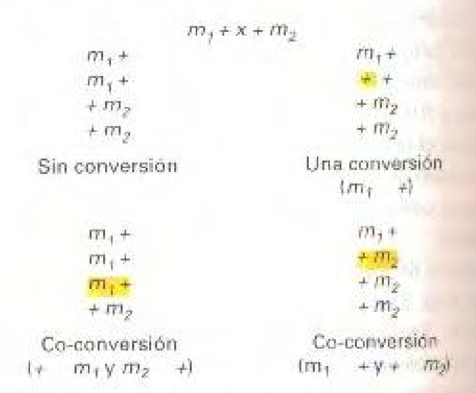
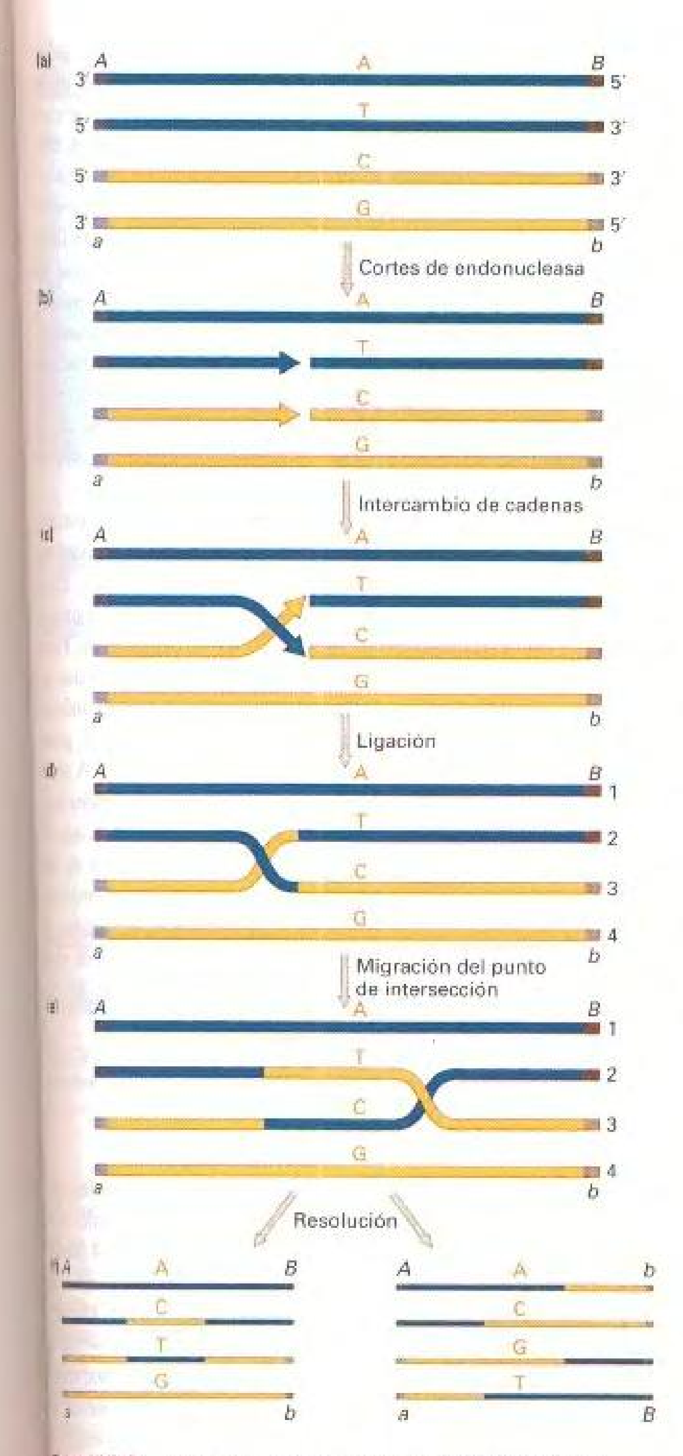


Figura 19-8. Tipos de patrones de ascas obtenidos por un solo hecho de conversión y por co-conversión.

Modelo de Holliday

Robin Holliday propuso uno de los primeros modelos versátiles para explicar las observaciones anteriores. Las características claves del **modelo de Holliday** son la formación de un DNA **heterodúplice**; la creación de un **punto de intersección**; su des-



gura 19-9. Mecanismo prototipo para la recombinación genética. muestran dos doble hélices. Cada pareja representa una cromátida y las dos representan dos cromátidas no hermanas. Las hélices están alineadas que la cadena inferior de la primera hélice tiene la misma que la cadena superior de la segunda hélice. (b) Se cortan las dos paralelas o las dos antiparalelas. (c) Los extremos libres se asocian con las complementarias de la doble hélice homóloga. (d) La ligación dobles hélices parcialmente heterodúplices, la estructura de Holliday. migración del punto de intersección se produce por intercambio entre las dos cadenas polinucleotídicas que toman parte en el miento. (f) La resolución sucede de una de dos formas posibles, que se en detalle más tarde. (Tomado de H. Potter y D. Dressler, *Cold Harbor Symposium on Quantitative Biology* 43, 1979, 970. Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.)

plazamiento a lo largo de las dos cadenas heterodúplices, fenómeno denominado **migración del punto de intersección**; la **reparación de emparejamientos erróneos**, y la posterior **resolución**, o empalme, de la estructura intermedia para dar lugar a diferentes tipos de moléculas recombinantes. La Figura 19-9 muestra una representación del modelo.

Rotura enzimática y formación del DNA heterodúplice

En la Figura 19-9*a* podemos ver dos dobles hélices homólogas alineadas, aunque observe que se han rotado de manera que la cadena inferior de la primera hélice tiene la misma polaridad que la cadena superior de la segunda hélice (5′ → 3′, en este caso). A continuación, una nucleasa corta las dos cadenas que tienen la misma polaridad (Fig. 19-9*b*). Los extremos libres abandonan sus cadenas complementarias originales y establecen puentes de hidrógeno con las cadenas complementarias de la doble hélice homóloga (Fig. 19-9*c*). La ligación produce la estructura mostrada en la Figura 19-9*d*. Esta doble hélice parcialmente heterodúplice es un intermediario fundamental en la recombinación. Se trata de la denominada **estructura de Holliday**.

Migración del punto de intersección

La estructura de Holliday forma un punto de intersección, o de ramificación, que puede desplazarse, o migrar, a lo largo del heterodúplice (Figs. 19-9*d* y *e*). Este fenómeno de migración del punto de intersección es una propiedad distintiva de la estructura de Holliday. La Figura 19-10 muestra una visión más realista de esta estructura, tal como puede aparecer durante la migración del punto de intersección.

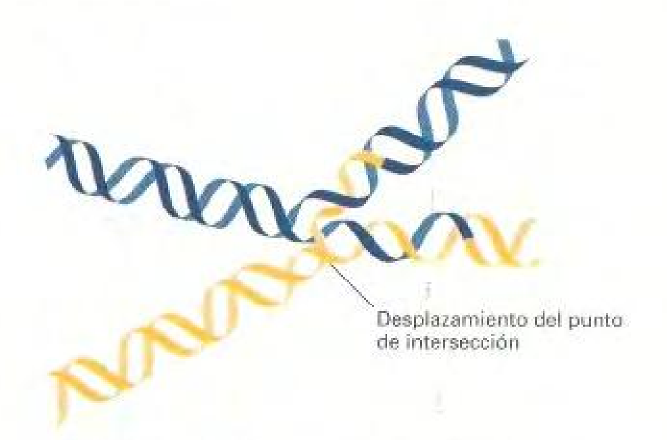
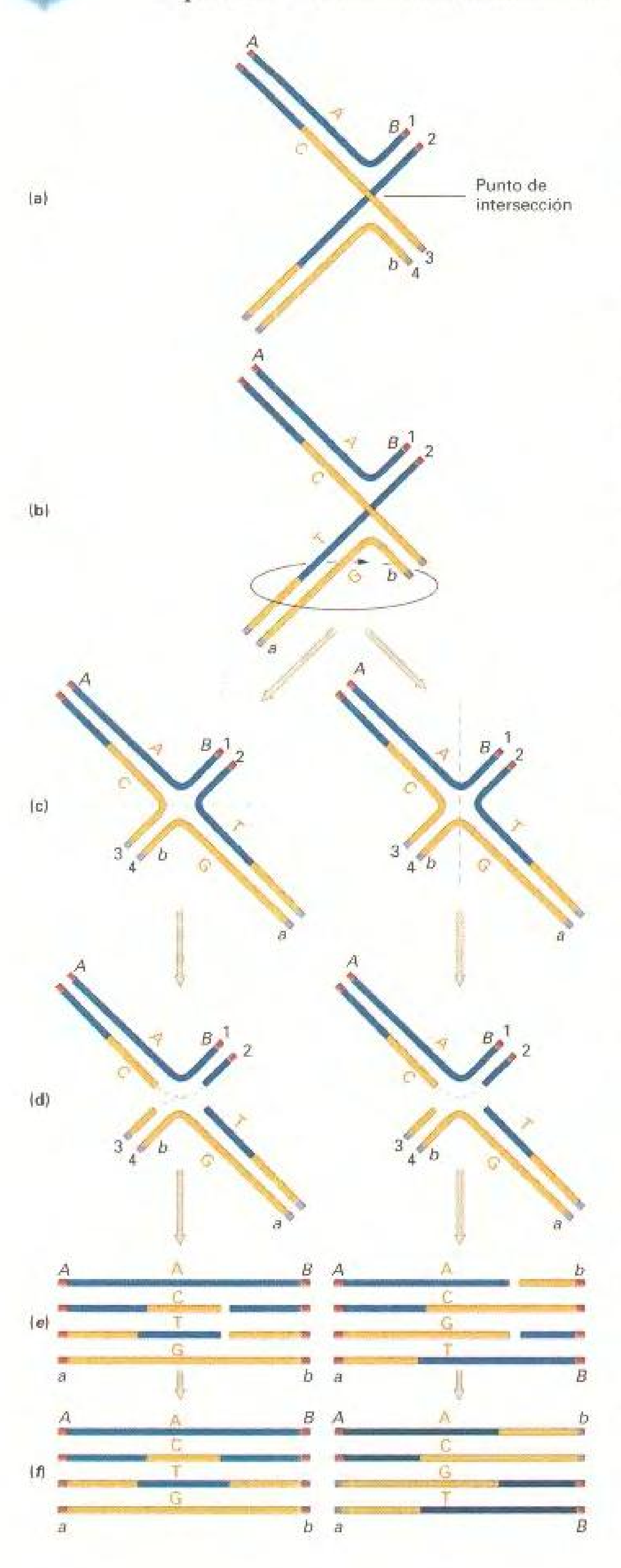


Figura 19-10. Migración del punto de intersección o desplazamiento del punto de entrecruzamiento entre las dos moléculas de DNA. (Tomado de T. Broker, *Journal of Molecular Biology* 81, 1973, 1; de J. D. Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4.ª ed. Copyright © 1987 de Benjamin Cummings.)

Resolución de la estructura de Holliday

La estructura de Holliday puede resolverse mediante el corte y ligación de las dos cadenas que se intercambiaron al principio (Fig. 19-9*f*, a la izquierda) o de las dos cadenas que no se inter-



cambiaron (Fig. 19-9*f*, a la derecha). En el primer caso, se genera un par de dobles hélices parentales, con la excepción de un tramo situado hacia la mitad que contiene una cadena de cada parental. Si las dos dobles hélices parentales tuvieran alelos diferentes en este tramo, como se indica en la figura, el DNA resultante sería heterodúplice. En la segunda resolución se generan dos dobles hélices recombinantes, ambas con un tramo de DNA heterodúplice. El modelo de Holliday propone también que los emparejamientos erróneos en el DNA heterodúplice se pueden reparar por la acción de un sistema de corrección enzimática que reconoce los emparejamientos erróneos y escinde la base mal emparejada de una de las dos cadenas, rellenando el hueco de la base escindida con la base complementaria correcta. Las moléculas resultantes llevarán el alelo silvestre o el mutante, dependiendo de cuál de ellos hubiera sido escindido.

La Figura 19-11 muestra de una forma que podemos visualizar fácilmente cómo la estructura de Holliday puede convertirse en las estructuras recombinantes que nos son familiares. En la Figura 19-11*a* podemos observar la estructura que se representaba de forma extendida en la Figura 19-4*e*. Compare las Figuras 19-9*e* y 19-11*a* hasta que se convenza de que estas dos estructuras son realmente equivalentes. Si giramos la parte inferior de esta estructura, como se muestra en la Figura 19-11*b*, podemos generar la forma representada en la Figura 19-11*c*. A partir de esta última forma se pueden volver a obtener dos dobles hélices mediante el corte enzimático de sólo dos cadenas. Como se indica en la Figura 19-11*c*, la rotura se puede producir de dos formas alternativas, cada una de las cuales genera un producto distinto (Fig. 19-11*d*). Las estructuras resultantes se pueden visualizar de forma más sencilla (Fig. 19-11*e*). La síntesis de reparación produce las moléculas recombinantes finales (Fig. 19-11*f*). Observe los dos tipos diferentes de recombinantes.

Aplicación del modelo de Holliday a los cruzamientos genéticos

El modelo de Holliday da una explicación correcta a los fenómenos que hemos descrito previamente. La conversión génica y las segregaciones anormales representadas en la Figura 19-4 pueden ser el resultado de la reparación de emparejamientos erróneos, tal y como muestran la Figura 19-12 y el Cuadro 19-1. Por simplicidad, en el Cuadro 19-1 se utilizan los símbolos + para el silvestre y *m* para el mutante. Cuando se corrigen ambos emparejamientos erróneos para dar lugar al mismo tipo parental, se obtienen las segregaciones 6:2 ó 2:6; cuando sólo se corrige un heterodúplice, se obtiene una segregación 5:3, y cuando no hay corrección, el producto es una segregación 4:4 anormal.

Figura 19-11. (a) Estructura de Holliday representada de forma extendida. (b) La rotación de la estructura dibujada en a da lugar a la forma representada en c. La resolución de la estructura mostrada en c puede realizarse de dos maneras, dependiendo de los sitios en los que se produzca la rotura enzimática, dando lugar a las estructuras mostradas en d. Las líneas de puntos muestran los segmentos que volverán a unirse para formar las cadenas recombinantes en cada uno de los tipos de rotura. Las cadenas se muestran linearizadas en e, pudiendo repararse como se indica en f. (Tomado de H. Potter y D. Dressler, *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 43, 1979, 970. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.

CUADRO 19-1. Corrección de una o ambas moléculas de DNA heterodúplice

	Cadenas de DNA al comienzo de la meiosis		Cadenas en el estado de DNA heterodúplice	Sin corrección	Corrección de un DNA heterodúplice a +	Corrección de los dos DNA heterodúplices a +
Dos cromosomas homólogos	_m_	Cuatro cromátidas con dos cadenas cada una	_m_			2 m
	_m_		_m_	3 m	3 m	
	_m_		_m_			
	_m_		_+_	1+		
	_+_		_m_	1 m		6+
	_+_		_+_		5+	
	_+_		_+_	3+		
	_+_		_+_			
				4:4 anormal	5:3	6:2

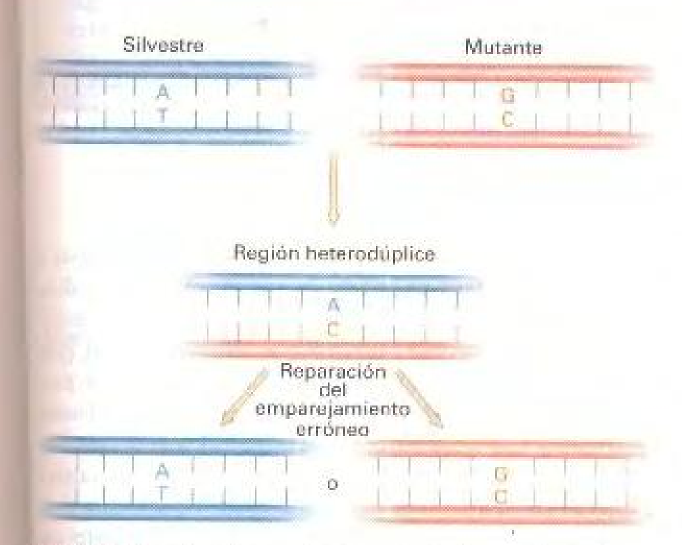


Figura 19-12. Cuando se produce un emparejamiento erróneo en la región heterodúplice, la reparación del emparejamiento erróneo da lugar a la secuencia silvestre o a la mutante.

El modelo de Holliday explica también la polaridad de los hechos de conversión génica, ya que la conversión sólo se produce en el DNA heterodúplice, y tiene lugar entre el punto de ruptura y el de intersección, donde se resuelve la estructura de Holliday. Cuanto más lejos está un locus génico del punto de ruptura, más probable es que quede más allá del punto de intersección y, por tanto, no forme parte del heterodúplice.

Hay que tener en cuenta que el fenómeno de conversión génica y su asociación con un entrecruzamiento en aproximadamente la mitad de los casos constituyó un argumento que impulsó la proposición del modelo de Holliday, que implica un intercambio de cadenas que resulta en entrecruzamientos recíprocos casi la mitad de las veces. Este 50 % de entrecruzamientos recíprocos se explica porque el punto de intercambio se puede resolver de dos formas igualmente probables, como se observa en la Figura 19-9*f*, una de las cuales produce el entrecruzamiento de los marcadores situados fuera de la región de DNA heterodúplice. La co-conversión se explica porque los dos sitios están en la región de DNA heterodúplice y se escinden en el mismo proceso de reparación por escisión. La doble escisión convierte a ambos sitios en el mismo tipo parental.

Modelo de Meselson-Radding

Conforme se fueron aumentando datos de análisis de tétradas, se llegó a la convicción de que el modelo de Holliday no lo podía explicar todo. Por ejemplo, los dos emparejamientos erróneos resultantes de los dos heterodúplices (véanse las Figuras 19-9e y 19-12) deberían manifestarse en la descendencia de un cruzamiento, dando lugar a tétradas 4:4 anormales. Sin embargo, el análisis de tétradas de levadura y otros organismos mostraba que, mientras que las tétradas 6:2 eran muy frecuentes en los procesos de conversión génica, las tétradas 4:4 anormales eran muy raras. Parecía como si la conversión génica y la formación del DNA heterodúplice sucedieran en primera instancia en una sola cromátida. El modelo propuesto por Meselson y Radding (mostrado en la Fig. 19-13) genera la estructura de Holliday con un corte de cadena sencilla en un solo cromosoma (Fig. 19-13*a*), en contraste con el modelo de Holliday, en el que se produce una incisión en una de las cadenas de cada una de las dos cromátidas homólogas. Al corte de cadena sencilla le sigue la síntesis de DNA (Fig. 19-13*b*). Tras la incisión, la cadena sencilla desplazada invade la segunda doble hélice (Fig. 19-13*c*), formándose un bucle que es escindido (Fig. 19-13*d*). Después de la ligación para producir la estructura de Holliday, a la que le sigue la migración del punto de intersección (Fig. 19-13*e*), se genera un heterodúplice en cada uno de los cromosomas. La resolución de este intermediario (Fig. 19-13*f*) ocurre exactamente como se representa en la Figura 19-9 (o tras la rotación, como en la Fig. 19-11). Observe la ausencia de simetría en la resolución del DNA heterodúplice en la Figura 19-13*f* (izquierda), cuando se compara con las Figuras 19-9*f* y 19-11*f*. Por tanto, en el modelo de Meselson-Radding (parte izquierda), es la cromátida inferior (en la Fig. 19-13) la que tiene una región heterodúplice, en lugar de formarse regiones heterodúplices en las dos cromátidas, como sucede en el modelo de Holliday. No obstante, la migración del punto de intersección y la isomerización pueden generar una estructura que tiene regiones heterodúplices en ambas cromátidas (Fig. 19-13, parte derecha), lo que permite explicar las segregaciones 4:4 anormales (Cuadro 19-1).

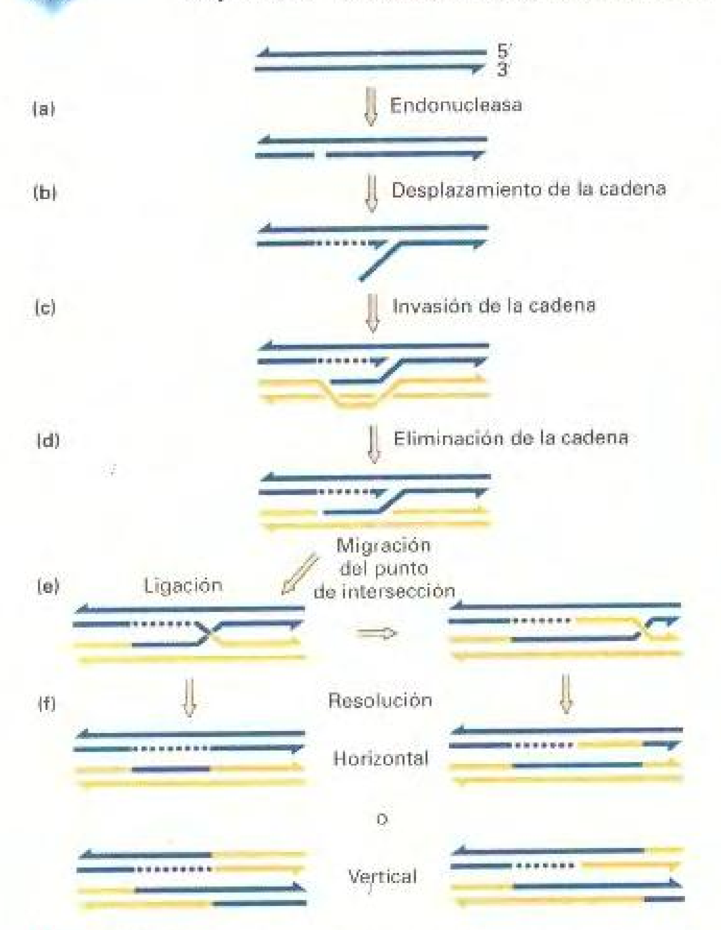


Figura 19-13. Modelo heterodúplice de Meselson-Radding. (a) Se corta una de las cadenas de una doble hélice. (b) La polimerasa de DNA desplaza una cadena. (c) La cadena sencilla resultante desplaza a su equivalente en la doble hélice homóloga. (d) Esta cadena desplazada es digerida enzimáticamente. (e) La ligación completa la formación de la estructura de Holliday, que es genéticamente asimétrica en el sentido de que sólo una de las dobles hélices tiene una región de DNA potencialmente heterodúplice. Si migra el punto de intersección, el DNA heterodúplice puede aparecer en ambas dobles hélices. (f) La resolución de la estructura tiene lugar como en el modelo de Holliday. (Tomado de F. W. Stahl, «The Holliday Junction on Its Thirtieth Anniversary» *Genetics* 138, 1994, 241-246.)

Modelo de recombinación por rotura y reparación de doble cadena

En los modelos de recombinación genética de Holliday y de Meselson-Radding, los hechos iniciales para la recombinación son incisiones de cadena sencilla que resultan en la formación de un DNA heterodúplice. Sin embargo, el hecho de que se produzca una estimulación de 1000 veces en la transformación de la levadura cuando se introduce una rotura de doble cadena en un plásmido circular impulsó el que se propusiera un modelo adicional, el modelo de rotura de doble cadena que se muestra en la Figura 19-14. Inicialmente propuesto por Jack Szostak, Terry Orr-Weaver y Rodney Rothstein, este modelo recurre a roturas de doble cadena en el inicio de la recombinación. Las roturas se extienden formando huecos, siendo la reparación de los huecos de doble cadena lo que da lugar a la conversión génica. La Figura 19-14 representa las características claves de este modelo: (1) una rotura de doble cadena, seguida de la digestión de los extremos 5′ de los dos sitios cortados; (2) la invasión de una cadena de la otra doble hélice no cortada; (3) la síntesis de reparación de una cadena; (4) la síntesis de reparación de la otra cadena y la ligación para formar dos uniones de Holliday; (5) resolución en una de dos formas posibles, una de las cuales genera un entrecruzamiento recíproco, y (6) reparación y corrección del emparejamiento erróneo para dar lugar a conversión génica.

COROLARIO

El fenómeno de la conversión génica proporcionó las claves que llevaron al desarrollo de modelos de DNA heterodúplice para explicar el mecanismo de entrecruzamiento. Lo normal es que en los cruzamientos se observen segregaciones mendelianas de alelos (1:1), ya que es raro que un locus heterocigótico esté en el punto exacto de intercambio cromosómico. Recuerde que las ascas en las que se observa conversión génica en un locus heterocigótico son relativamente raras (del orden del 1 %).

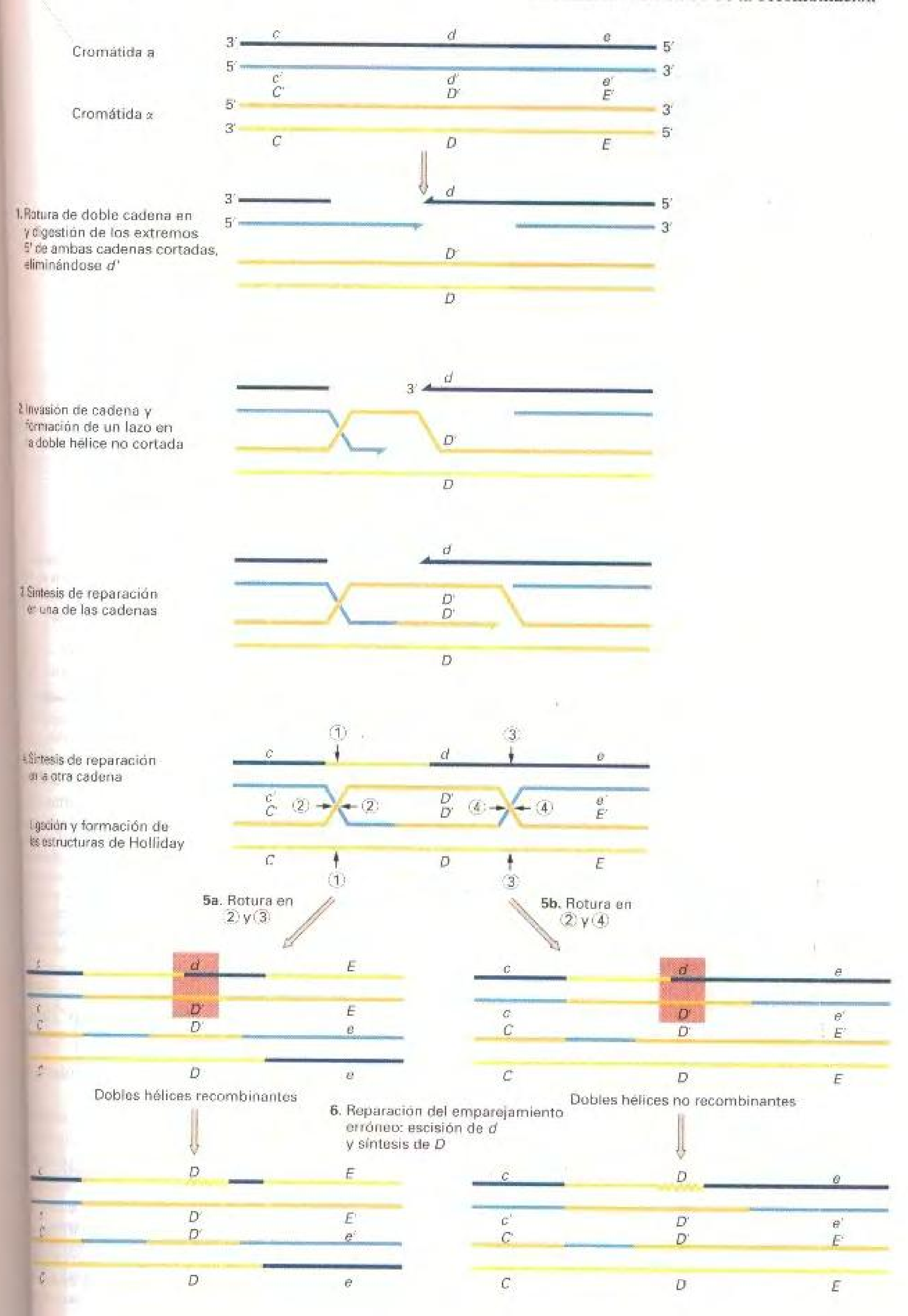
Visualización de los intermediarios de la recombinación

Se ha demostrado que varias de las etapas que constituyen el modelo de Holliday, como el corte, el desplazamiento de las cadenas, la migración del punto de intersección, la síntesis de reparación y la ligación, tienen lugar *in vivo* o *in vitro*. H. Potter y D. Dressler demostraron que los intermediarios del tipo predicho por el modelo de Holliday aparecen en fagos recombinantes o plásmidos. La Figura 19-15 muestra una micrografía electrónica de una molécula recombinante. Es formalmente equivalente a la pareja central de dobles hélices mostrada en la Figura 19-11 con dos de los brazos rotados para producir el «diamante» central de cadena sencilla, como en la Figura 19-11*c*, que está situado entre las secciones de DNA de doble cadena.

Mecanismo enzimático de la recombinación

El aislamiento de mutantes defectuosos en algunas de las etapas de la recombinación ha permitido aclarar muchos de los aspectos de la enzimología de este proceso. En *E. coli*, se han caracterizado bastante bien los productos de varios genes implicados en

Figura 19-14. Modelo de rotura de doble cadena para la recombinación meiótica en la levadura *S. cerevisiae*. Se muestran las dos cadenas de ambas cromátidas (en azul y amarillo). Los colores más oscuro y más claro indican las cadenas complementarias, al igual que las letras sin prima con respecto de las que la llevan (por ejemplo, *C* y *C′* o *c* y *c′* para designar los alelos). Un punto clave de este modelo se muestra en las etapas 3 y 4, en las que se representa la formación de una estructura de Holliday con dos entrecruzamientos. Las dos formas diferentes de resolver esta estructura conducen a las dobles hélices recombinante o no recombinante mostradas en las etapas 5a y 5b. El rectángulo rojo muestra las regiones heterodúplice con emparejamientos erróneos para los alelos *d* y *D′*. La reparación de este emparejamiento erróneo da como resultado la «conversión» de d en D. (Véase el Cuadro 19-1 para los posibles patrones de segregación que resultan de la reparación de emparejamientos erróneos). (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipurski, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)



Cromátida a
Cromátida α
1. Rotura de doble cadena en y digestión de los extremos 5' de ambas cadenas cortadas, eliminándose d'
2. Invasión de cadena y formación de un lazo en la doble hélice no cortada
3. Síntesis de reparación en una de las cadenas
4. Síntesis de reparación en la otra cadena
Ligación y formación de las estructuras de Holliday
5a. Rotura en ② y ③
5b. Rotura en ② y ④
Dobles hélices recombinantes
Dobles hélices no recombinantes
6. Reparación del emparejamiento erróneo: escisión de d y síntesis de D

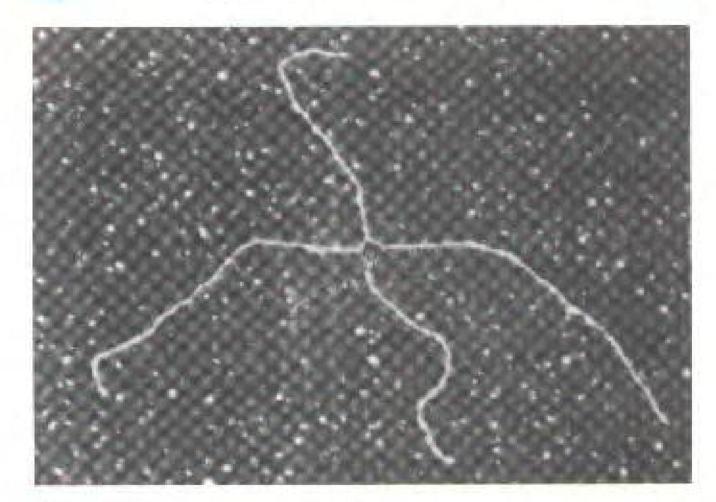


Figura 19-15. Intermediario de la recombinación entre plásmidos. Se muestran cuatro brazos de doble cadena y un «diamante» de cadena sencilla que los une. Éste es el mismo tipo de intermediario que se propone en el modelo de DNA heterodúplex para la recombinación en los eucariotas y es formalmente equivalente a la estructura mostrada en la Figura 19-11c. (Fotografía por cortesía de H. Potter y D. Dressler.)

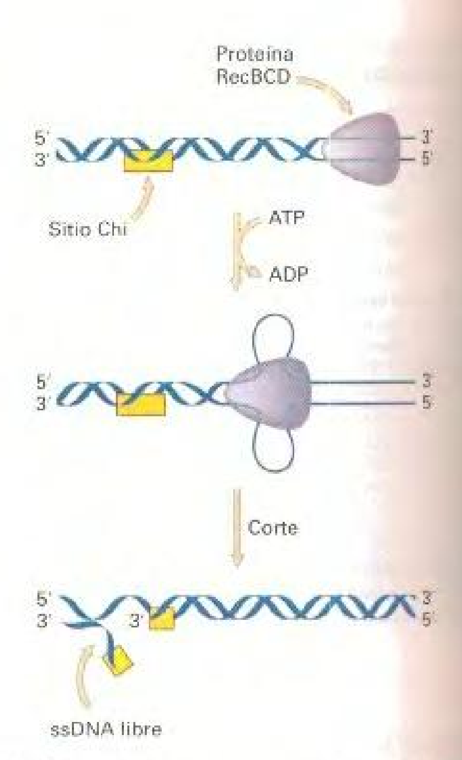


Figura 19-16. Modelo para la formación de DNA de cadena sencilla por el complejo RecBCD (morado), una helicasa y nucleasa dependiente de ATP. Los dos bucles de cadena sencilla aparecen conforme el complejo se mueve. La enzima corta una de las dos cadenas cuando encuentra una secuencia chi (amarillo), dando lugar a un DNA de cadena sencilla (ssDNA) con un extremo libre. La recombinación tiene lugar en este momento. (Tomado de A. Taylor y G. R. Smith, *Cell* 22, 1980, 447; de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.)

la recombinación generalizada —los genes *recA*, *recB*, *recC* y *recD*—, así como la proteína de unión a DNA de cadena sencilla (Ssb). Los mutantes afectados en cualquiera de estas proteínas presentan una disminución en su capacidad de recombinación. De hecho, se han identificado tres rutas diferentes de recombinación. Además de la ruta principal RecBCD, hay dos vías secundarias, RecF y RecE, que se activan en ciertas situaciones. La proteína RecA participa en las tres rutas.

Producción de DNA de cadena sencilla

Un complejo proteico formado por las proteínas RecB, RecC y RecD realiza probablemente una de las etapas iniciales de la recombinación, el corte y desenrollamiento del DNA de doble cadena. El complejo tiene actividades helicasa y nucleasa. La Figura 19-16 muestra cómo este complejo desenrolla el DNA, empleando la hidrólisis de ATP conforme se desplaza y genera cadenas sencillas a partir de una molécula de doble cadena. La actividad nucleásica reconoce una secuencia de 8 pb:

5' G C T G G T G G 3'

denominada **sitio chi**. Estos sitios chi aparecen aproximadamente cada 64 kb. Conforme el complejo desenrolla el DNA, el DNA de cadena sencilla generado se puede utilizar para iniciar la recombinación. La proteína Ssb, que también participa en la replicación (Cap. 8), se une a las cadenas sencillas y las estabiliza.

Intercambio de cadena sencilla mediado por RecA

La proteína RecA, que participa también en la inducción del sistema de reparación SOS (véase el Cap. 16), se une por todo lo largo de las cadenas sencillas, formando filamentos nucleoproteicos. RecA cataliza la invasión de una doble cadena de DNA por una cadena sencilla y el posterior desplazamiento de la cadena correspondiente del DNA de doble cadena. La invasión y el desplazamiento tienen lugar en presencia de ATP, como se muestra en la Figura 19-17. La cadena desplazada forma el denominado **lazo D**. La Figura 19-18 representa cómo esta secuencia de sucesos lleva a la estructura de Holliday.

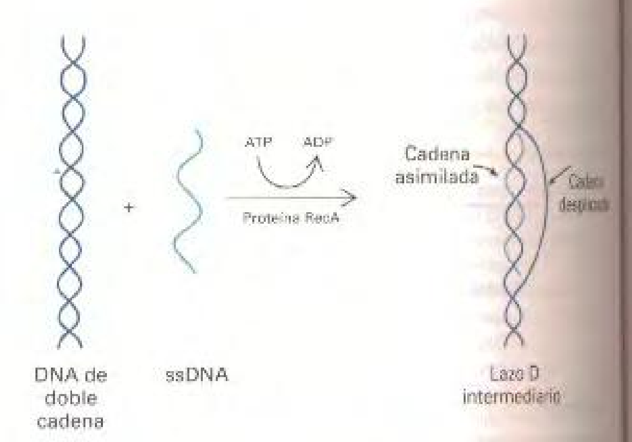


Figura 19-17. La proteína RecA cataliza el apareamiento de una molécula de DNA de cadena sencilla (ssDNA) con su cadena complementaria de una doble hélice. La estructura resultante se denomina *lazo D*. La hidrólisis de ATP libera la proteína RecA del DNA. (Tomado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.)

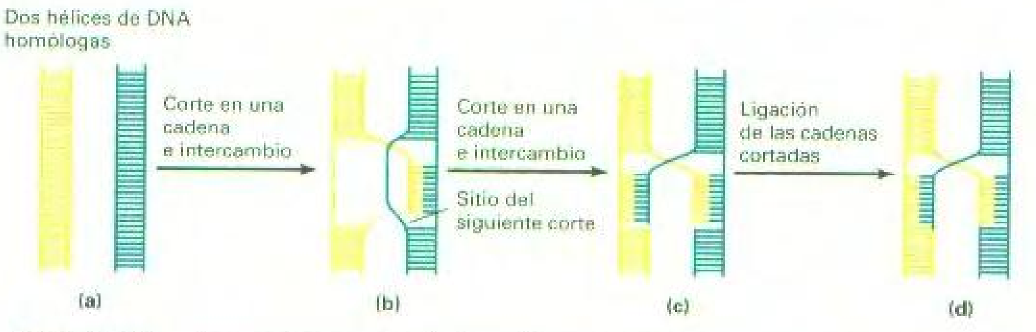


Figura 19-18. Representación esquemática de algunas de las etapas de la recombinación. (a) Apareamiento de dos dobles hélices homólogas. (b) La nucleasa RecB,C realiza un corte. La hélice se desenrolla parcialmente, y la proteína Ssb extiende y estabiliza la región de cadena sencilla. La proteína RecA cataliza la invasión del DNA de doble cadena por la cadena sencilla. La proteína Ssb ayuda a mantener libre la cadena sencilla. (c) Tras el corte realizado por la nucleasa RecB,C, la cadena sencilla de la segunda doble hélice, que ha quedado libre, empareja con la primera doble hélice. (d) La ligasa de DNA sella esta estructura. (Tomado de B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*. Copyright © 1983 de Garland Publishing.)

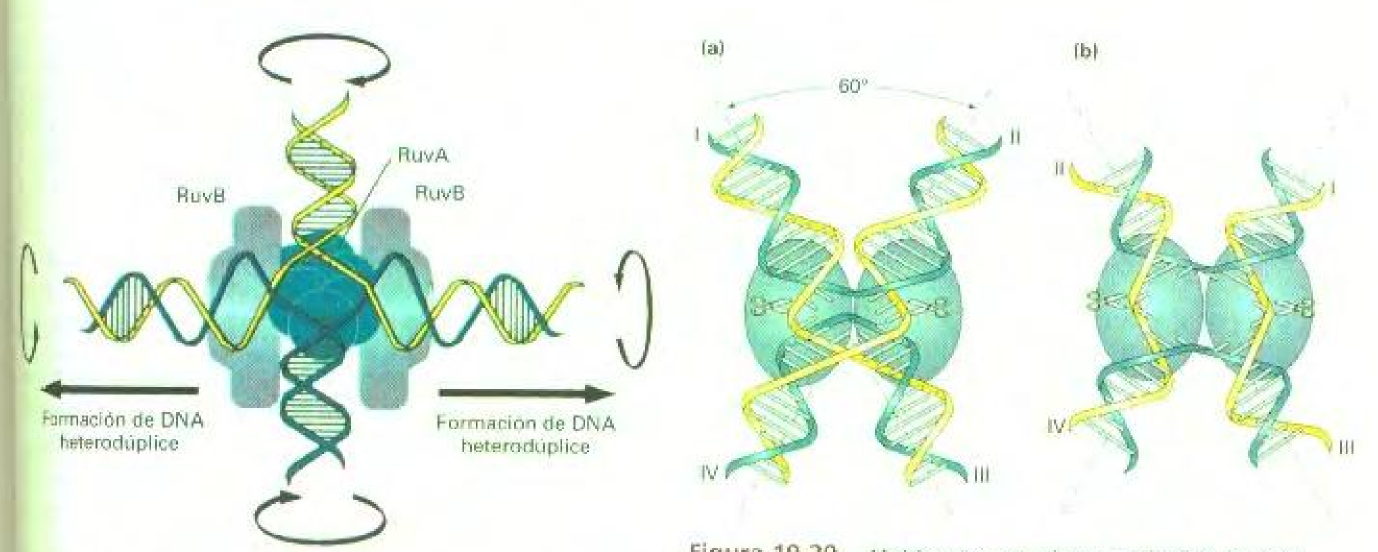


Figura 19-19. Modelo de migración del punto de intersección mediada por RuvAB. Las esferas azules representan la proteína RuvA, que se une al entrecruzamiento de la estructura de Holliday —complejo RuvAB. Los anillos de hexámeros de RuvB flanquean la proteína RuvA. Los dos anillos motores de RuvB están en orientaciones opuestas y actúan sobre la migración del punto de intersección favoreciendo el paso del DNA. (Tomado de Carol A. Parson, Andrzej Stasiak, Richard J. Bennett y Stephen C. West, «Structures of a Multisubunit Complex That Promotes DNA Branch Migration», *Nature* 374, 1995, 377.)

Figura 19-20. Modelo que muestra el corte por RuvC de dos de las cuatro cadenas en el punto de intercambio antiparalelo de la estructura de Holliday. Las tijeras representan los sitios en los que se produce un corte simétrico. (a) En este caso, el corte resuelve una estructura en X apilada. (b) El corte resuelve un punto de intercambio desplegado. La estructura simétrica desplegada que se muestra se forma por una rotación de 180° de los brazos I y II en la estructura representada en (a). (Tomado de Richard J. Bennett y Stephen C. West, «RuvC Protein Resolves Holliday Junctions via Cleavage of the Continuous (Noncrossover) Strands», *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92, 1995, 5639.)

Migración del punto de intersección

El desplazamiento de la zona de unión que da lugar a la estructura de Holliday (véanse, p. ej., las Figs. 19-9 y 19-10), o migración del punto de intersección, aumenta el tamaño del DNA heterodúplice. Las proteínas RuvA y RuvB catalizan la migración del punto de intersección, empleando la hidrólisis del ATP. La proteína RuvA se une al punto de entrecruzamiento y, a continuación, queda flanqueada por dos anillos de hexámeros de la ATPasa RuvB. La Figura 19-19 representa un modelo de la acción de estas proteínas en la migración del punto de intersección.

Resolución de la estructura de Holliday

Se han identificado varias rutas enzimáticas que cortan en el punto de intercambio de las cadenas de la estructura de Holliday para dar lugar a dos DNA de doble cadena. RuvC es una endonucleasa que resuelve la estructura de Holliday mediante el corte simétrico del par de cadenas continuas de DNA (no entrecruzadas), como se observa en la Figura 19-20. Además, las proteínas RecG y Rus pueden proporcionar rutas alternativas de corte. La Figura 19-21 resume estas reacciones.

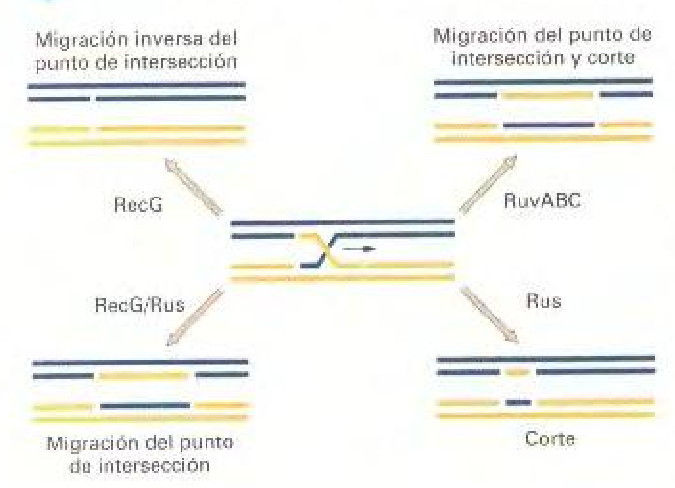


Figura 19-21. Posibles rutas para el procesamiento de la estructura de Holliday en *E. coli*. El centro de la figura muestra una estructura de Holliday formada por apareamiento homólogo e intercambio de cadena mediado por la proteína RecA. En presencia de RecA, la migración del punto de intersección tiene lugar en la misma dirección que el intercambio de cadena mediado por RecA y es promovido por RuvAB. El corte con RuvC resuelve esta estructura *(arriba a la derecha)*. También en presencia de RecA, RecG podría dirigir el punto de intersección en la dirección contraria *(arriba a la izquierda)*. Sin embargo, si RecA se disocia del punto de ramificación, RecG podría dirigir la reacción hacia delante, teniendo lugar la resolución mediante la acción de la proteína Rus *(abajo a la izquierda)*. Abajo a la derecha se muestra el resultado del corte producido por la proteína Rus sola, después del intercambio de cadena y la migración del punto de intersección mediados por RecA. (Tomado de Gary Sharples, Sau Chan, Akeel Mahdi, Matthew Whitby y Robert Lloyd, «Processing of Intermediates in Recombination and DNA Repair: Identification of a New Endonuclease That Specifically Cleaves Holliday Junctions», *EMBO Journal* 13, 1994, 6140.)

RESUMEN

Estamos alcanzando un mayor conocimiento de los procesos moleculares que subyacen en la recombinación, fenómeno que origina nuevas combinaciones alélicas mediante el intercambio entre cromosomas homólogos. Pruebas genéticas y físicas han conducido a que se hayan propuesto varios modelos para la recombinación que se basan en varias características comunes: formación de DNA heterodúplice, reparación de emparejamientos erróneos y resolución (o empalme) de la estructura intermediaria para dar lugar a moléculas recombinantes. El propio fenómeno de la recombinación está bajo control genético, habiéndose identificado numerosos genes que intervienen en el proceso.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

entrecruzamiento / heterodúplice / quiasma / conversión génica / corrección / segregación no mendeliana / recombinación / 5:3 emparejamiento erróneo de bases / heterocigoto

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

En los capítulos anteriores hemos estudiado los diversos mecanismos que causan la aparición de mutaciones, tanto de forma espontánea como con el uso de mutágenos. Describa el fenómeno de la conversión génica y cómo podría distinguirlo de la mutación.

♦ Solución ♦

La conversión génica es un proceso meiótico de cambio dirigido mediante el que un alelo dirige la conversión en su propia forma de otro alelo. En lugar de finalizar con números iguales de ambos alelos durante la meiosis, la conversión génica produce un exceso de un alelo y una deficiencia del otro. Los modelos de recombinación que contemplan la formación de DNA heterodúplice ofrecen mecanismos verosímiles para la conversión génica. En contraste, la mutación es un cambio no dirigido que puede ocurrir tanto en meiosis como en mitosis.

PROBLEMAS RESUELTOS

1. Un doble mutante *ade3* de Neurospora tiene dos sitios mutados en el gen *ade3* —el sitio *1* a la la izquierda y el sitio *2* a la derecha. Se cruza este mutante con un silvestre *ade*⁺, donde *A* y *B* son dos loci flanqueantes estrechamente ligados y + representa la secuencia silvestre en las posiciones mutantes:

$$A\ 1\ 2\ B \times a\ +\ +\ b$$

La mayoría de las ascas obtenidas fueron de los tipos esperados en las segregaciones mendelianas regulares, pero algunas fueron de tipos no esperados, de las que se presentan algunos ejemplos (I a III).

I	II	III
A 1 2 B	*A 1 2 B*	*A 1 2 B*
A 1 2 B	*A 1 2 B*	*A 1 2 B*
A 1 2 b	*A 1 2 B*	*A 1 2 B*
A + + b	*A 1 2 B*	*A + + B*
a 1 2 B	*a + + b*	*a + 2 b*
a + + B	*a 1 2 b*	*a + + b*
a + + b	*a + + b*	*a + + b*
a + + b	*a + + b*	*a + + b*

Explique el origen probable de estos tipos raros, de acuerdo con los modelos moleculares de recombinación.

♦ Solución ♦

El asca de tipo I tiene dos pares de esporas hermanas no idénticas. Como los miembros de cada par de esporas derivan de una mitosis posmeiótica (véase el Cap. 6), se deduce que los productos meióticos en esos casos debían contener tanto información *1 2* como + +; en otras palabras, debían tener DNA heterodúplice. Observe también que estas parejas de esporas son recombinantes para *A* y *B*. Por lo tanto, es probable que hubiese ocurrido un entrecruzamiento entre los loci *A* y *B*, que el DNA heterodúplice del entrecruzamiento abarcara los sitios mutantes *1* y *2* de *ade3* y que no se produjera corrección del heterodúplice en esos puntos.

El tipo II muestra una segregación 5:3 de *1 2* respecto a + +. De nuevo, en este caso, el heterodúplice debía extenderse sobre los dos sitios (en una configuración de no entrecruzamiento), pero esta vez hubo corrección del heterodúplice + +/*1 2* a *1 2*/*1 2* presumiblemente por escisión y reparación de la información + + (co-conversión o doble conversión).

El tipo III revela la formación de otro heterodúplice en configuración de no entrecruzamiento y esta vez la corrección tuvo lugar sólo en el sitio *1*, según pone de manifiesto la segregación 3:5 para el sitio *1*, con conversión *1* → + en la ascospora 5.

2. En cruzamientos de hongos del siguiente tipo general,

M [+ *2*] *N*

×

m [*1* +] *n*

donde *1* y *2* son sitios mutantes de un gen nutricional, y *M* y *N* son loci flanqueantes, resulta posible la selección de recombinantes protótrofos + + raros mediante siembra en medio mínimo. Se analizan los alelos de los loci flanqueantes en estos protótrofos. Como cabía esperar, la combinación

M + + n

se encuentra con una frecuencia elevada. No obstante, de forma sorprendente aparecen también

M + + N

y

m + + n

a. Explique el origen de estos dos genotipos basándose en los modelos moleculares de recombinación.

b. ¿Qué significado tendría el que la combinación *M + + N* fuera más frecuente que la *m + + n*?

♦ Solución ♦

a. Es probable que las combinaciones *M + + N* aparecieran a partir de un heterodúplice sin entrecruzamiento que abarcara el sitio *2*, seguido de una corrección *2* → +.

DNA: + 2 / + + ⟶ + + / + +

De forma similar, *m + + n* se explicaría por un heterodúplice que se extendiera sobre el sitio *1* y la corrección fuera en el sentido *1* → +.

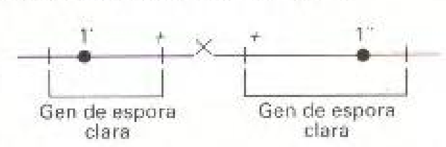
b. Como la combinación *M + + N* se produce por conversión génica en el lado derecho, es probable que el DNA heterodúplice se forme en el lado derecho con mayor frecuencia que en el izquierdo, posiblemente porque haya un sitio de rotura fijo más cercano. (**Nota:** los protótrofos también se pueden formar por una sola corrección en un heterodúplice que abarque los dos sitios, aunque entonces la desigualdad requeriría otra explicación).

PROBLEMAS

1. ¿Cuál de las siguientes ascas lineales presenta conversión génica en el locus *arg2*?

1	2	3	4	5	6
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	*arg*	+	+	*arg*	*arg*
+	*arg*	*arg*	*arg*	*arg*	*arg*
arg	*arg*	*arg*	+	+	*arg*
arg	*arg*	*arg*	*arg*	+	*arg*
arg	+	*arg*	*arg*	*arg*	*arg*
arg	+	*arg*	*arg*	*arg*	*arg*

2. En el locus espora clara de *Ascobolus*, el sitio mutante *1'* está en la parte izquierda del gen y el sitio mutante *1''* está más hacia la derecha. Cuando se realizan cruzamientos entre estirpes con las mutaciones *1'* y *1''*,

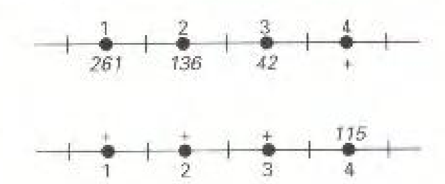


se pueden seleccionar visualmente ascas con seis esporas claras y dos negras. Se demuestra que la mayoría se debe a conversión génica del siguiente tipo:

$+\ l''$	aunque muy raramente	$+\ l''$
$+\ l''$		$+\ l''$
$+\ l''$		$++$ } negras
$+\ l''$		$++$ }
$++$ } negras		$l'+$
$++$ }		$l'+$
$l'+$		$l'+$
$l'+$		$l'+$

¿A qué se puede deber esta irregularidad?

3. Se ha propuesto que el «punto fijo de rotura» del modelo de recombinación del heterodúplice pudiera corresponder a una secuencia promotora. Los siguientes datos guardan relación con esa idea. En el hongo *Podospora*, existen mutantes en los genes adyacentes 1 a 4, relacionados con el color de las esporas. Se realizó el siguiente cruzamiento:



(Los números *261*, *136*, *42* y *115* son sólo nombres de sitios mutantes). Se obtuvieron muchas ascas en las que se observaba conversión génica, si bien una de ellas que tuvo especial relevancia respecto a la propuesta comentada anteriormente, se indica a continuación:

Espora 1	*261*	*136*	*42*	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	*115*
4	+	+	+	*115*

Interprete esta asca en relación con la idea del promotor.

4. Muchos mutágenos aumentan la frecuencia de intercambio entre cromátidas hermanas. Ofrezca posibles explicaciones para esta observación.

5. Mutaciones en el locus *46* del hongo Ascomiceto *Ascobolus* producen ascosporas de color claro (que denominaremos mutantes *a*). En los siguientes cruzamientos entre distintos mutantes *a*, se buscaron ascas con esporas silvestres de color oscuro. En cada cruzamiento, todas esas ascas fueron de los genotipos siguientes:

$a_1 \times a_2$	$a_1 \times a_3$	$a_2 \times a_3$
↓	↓	↓
$a_1\ +$	$a_1\ +$	$a_2\ +$
$+\ +$	$a_1\ +$	$a_2\ +$
$+\ a_2$	$+\ +$	$+\ +$
$+\ a_2$	$+\ a_3$	$+\ a_3$

Interprete estos resultados a la luz de los modelos comentados en este capítulo.

6. En el cruzamiento $A\ m_1\ m_2\ B \times a\ m_3\ b$, se desconoce el orden relativo de los sitios mutantes m_1, m_2 y m_3, y respecto a *A/a* y *B/b*. Se obtiene la siguiente asca no lineal con conversión:

$A\ m_1\ m_2\ B$
$A\ m_3\ b$
$a\ m_1\ m_2\ B$
$a\ m_3\ b$

Interprete este resultado a la luz de la teoría del DNA heterodúplice y deduzca hasta donde le sea posible el orden de los sitios mutantes.

7. En el cruzamiento $a_1 \times a_2$ (alelos de un mismo locus) se obtuvo la siguiente asca:

$a_1\ +$
$a_1\ a_2$
$a_1\ a_2$
$+\ a_2$

Deduzca (a nivel molecular) los hechos que pueden haber originado esta asca.

8. G. Leblon y J.-L. Rossignol realizaron las siguientes observaciones en *Ascobolus*. Las mutaciones por inserción o deleción de un par de nucleótidos muestran conversiones génicas de los tipos 6:2 ó 2:6, y sólo raramente de los tipos 5:3, 3:5 ó 3:1:1:3. Las mutaciones por transición de un par de bases muestran conversiones génicas de los tipos 3:5, 5:3 ó 3:1:1:3, y sólo raramente de los tipos 6:2 ó 2:6.

   a. Proponga una explicación para estas observaciones sobre la base del modelo del DNA híbrido.

   b. Leblon y Rossignol mostraron también que hay bastantes menos conversiones 6:2 que 2:6 en el caso de las inserciones y bastantes más conversiones 2:6 que 6:2 en el de las deleciones (donde las proporciones son +:*m*). Explique estos resultados en función del DNA heterodúplice. (Piense también en la escisión de los fotodímeros de timina).

   c. Por último, los investigadores demostraron que, cuando se combina en una meiosis una mutación de cambio de fase con una transición en el mismo locus, en configuración cis, las ascas que presentan conversión *conjunta* son todas 6:2 ó 2:6 en ambos sitios (esto es, el patrón de conversión de cambio de fase parece haberse «impuesto» sobre la transición). Proponga una explicación para este resultado.

9. Se realiza el cruzamiento $+ \times g_1$, en el que está implicado el locus *gray* del hongo Ascomiceto *Sordaria*. En este cruzamiento, el DNA heterodúplice incluye a veces el sitio de heterocigosis, formándose dos moléculas de DNA heterodúplice (como se ha comentado en este capítulo). Sin embargo, la corrección del heterodúplice no tiene una eficacia del 100 %. De hecho, el 30 % de todos los DNA heterodúplices no se corrige en absoluto, mientras que el 50 % se corrige a + y el 20 % a g_1. ¿Qué porcentaje de las ascas con segregaciones anormales será **(a)** 6-:2? **(b)** 2:6? **(c)** 3:1:1:3? **(d)** 5:3? **(e)** 3:5?

10. Noreen Murray cruzó α y β, dos alelos del locus *me-2* de *Neurospora*. En el cruzamiento incluyó también dos marcadores, *trp* y *pan*, que flanquean a *me-2* a una distancia de [illegible] u.m. para cada uno de ellos. Las ascosporas se sembraron en

un medio que contenía triptófano y pantotenato, pero carecía de metionina. Se aislaron los protótrofos para metionina que crecieron y se analizaron los marcadores flanqueantes, obteniéndose los resultados que se indican debajo, en la tabla:

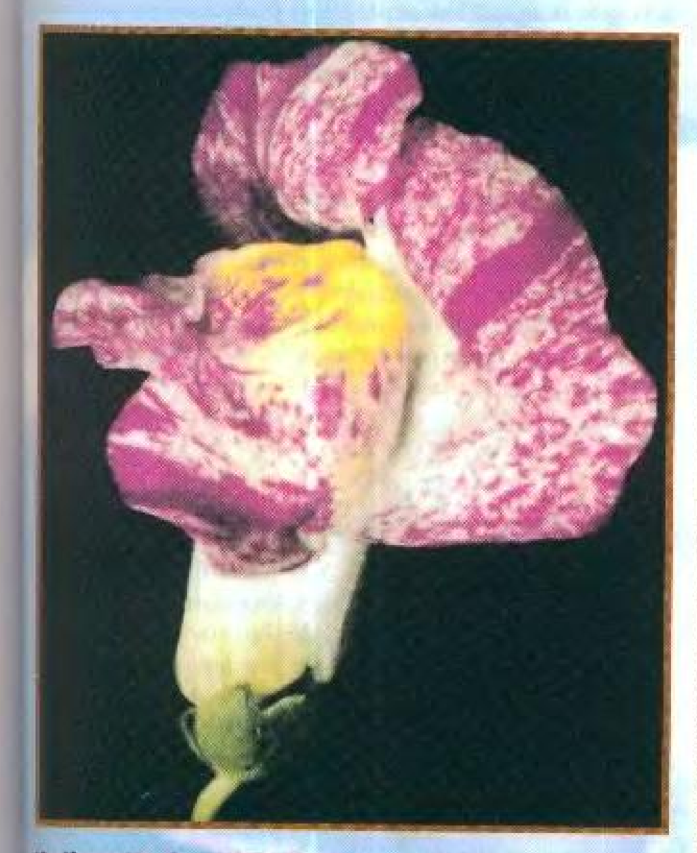
	GENOTIPO DE LOS PROTÓTROFOS *me-2*⁺			
Cruzamiento	*trp* +	+ *pan*	*trp pan*	+ +
trp α + × + β *pan*	26	59	16	56
trp β + × + α *pan*	84	23	87	15

Interprete estos resultados a la luz de los modelos presentados en este capítulo. Asegúrese de tener en cuenta las asimetrías entre las clases.

11. Se realiza en *Neurospora* el cruzamiento *A x* × *a y*, donde *x* e *y* son alelos del locus *his-1*, y *A* y *a* son los alelos del tipo sexual. La frecuencia de recombinación entre los alelos *his-1* se mide por la frecuencia de protótrofos al sembrar las ascosporas en un medio que carece de histidina. El valor de la frecuencia de recombinación es 10^{-5}. La descendencia de fenotipo parental se retrocruza con los padres, observándose los resultados siguientes. Toda la descendencia *a y* retrocruzada con el parental *A x* da una frecuencia de protótrofos de 10^{-5}. Cuando se retrocruza la descendencia *A x* con el parental *a y* se obtienen dos frecuencias de protótrofos: en la mitad de los cruzamientos es de 10^{-5}, pero en la otra mitad la frecuencia es mucho mayor, de 10^{-3}. Proponga una explicación para estos resultados y describa un protocolo de investigación para comprobar su hipótesis. (**Nota:** la recombinación intragénica es una función *meiótica* que ocurre en la célula diploide. Por lo tanto, aunque este organismo es haploide, los conceptos de dominancia y recesividad podrían tener su importancia en este problema.)

20

ELEMENTOS GENÉTICOS TRANSPONIBLES



Manifestación fenotípica de un «gen saltador» en boca de dragón (*Antirrhinum majus*).
Si el gen saltador se inserta en un gen implicado en la síntesis de pigmento, el resultado es el color blanco; cuando se escinde, se recupera la producción del pigmento. *(Heinz Saedler, Max-Planck Institut.)*

Ideas fundamentales

En ocasiones, una serie de elementos genéticos puede moverse, o transponerse, de una posición a otra del mismo cromosoma o de un cromosoma diferente.

Las secuencias de inserción, los transposones y el fago mu son ejemplos de elementos genéticos transponibles de bacterias.

Los elementos genéticos transponibles pueden producir reorganizaciones cromosómicas.

En células superiores, se han caracterizado con detalle elementos transponibles en levaduras, *Drosophila*, maíz y mamíferos.

En eucariotas, algunos elementos transponibles emplean un intermediario de RNA durante la transposición; mientras que en los procariotas, la transposición ocurre exclusivamente como DNA.

Comenzando en los años 30, los estudios genéticos del maíz, realizados de forma independiente por Barbara McClintock y Marcus Rhoades, proporcionaron resultados que trastocaron la imagen genética clásica de genes situados únicamente en loci fijos del cromosoma principal. La literatura científica comenzó a mostrar artículos que sugerían la existencia de elementos genéticos de los cromosomas principales que, de alguna manera, podían movilizarse a sí mismos y trasladarse de una posición a otra. Aunque estos descubrimientos se observaron con escepticismo durante muchos años, ahora está claro que tales elementos móviles se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza.

Estos elementos genéticos han recibido una variedad de nombres pintorescos (algunos de los cuales ayudan a describir sus propiedades respectivas): elementos controladores, casetes, genes saltadores, genes errantes, genes móviles, elementos genéticos móviles y transposones. Hemos escogido el término **elemento genético transponible**, que es formalmente el más correcto e incluye a la familia completa de tipos. El término *transposición* se ha utilizado en Genética desde hace mucho tiempo para describir la transferencia de tramos cromosómicos desde una posición a otra en las reorganizaciones estructurales importantes. En el contexto de este capítulo, lo que se transpone parece ser un gen, un número pequeño de genes ligados o un fragmento del tamaño de un gen. Cualquier entidad genética de este tamaño puede denominarse *elemento genético*.

Los elementos genéticos transponibles pueden moverse a posiciones nuevas dentro del mismo cromosoma o hacerlo incluso a un cromosoma diferente. No se sabe con certeza cuál es la función genética normal de estos elementos. Se detectaron genéticamente gracias a las anomalías que producían en las actividades y estructuras de los genes cercanos a las posiciones a las que se movían. También se han utilizado diversas técnicas físicas para detectarlos, incluyendo la secuenciación del DNA. Los elementos genéticos transponibles se han encontrado en la mayoría de los organismos en los que se han buscado.

En la actualidad, tanto en los procariotas como en los eucariotas, los elementos transponibles constituyen herramientas valiosas para la cartografía genética, la obtención de mutantes, la clonación de genes y la producción incluso de organismos transgénicos. Reconstruyamos algunas de las etapas de la evolución de nuestro conocimiento actual sobre los elementos transponibles. Haciendo esto, pondremos al descubierto los fundamentos relevantes de estas fascinantes unidades genéticas.

Elementos controladores del maíz

En 1938, Marcus Rhoades analizó una mazorca de maíz negro mexicano. La mazorca procedía de la autofecundación de una línea pura de genotipo pigmentado y, sin embargo, mostró una segregación mendeliana dihíbrida modificada que resultaba sorprendente, una 12:3:1 entre granos pigmentados, moteados e incoloros. El análisis demostró que habían sucedido dos hechos en loci no ligados. En un locus, el alelo A_1, implicado en la pigmentación, había mutado a a_1, un alelo que determina fenotipo no coloreado; en otro locus, había aparecido un alelo dominante *Dt* (moteado,

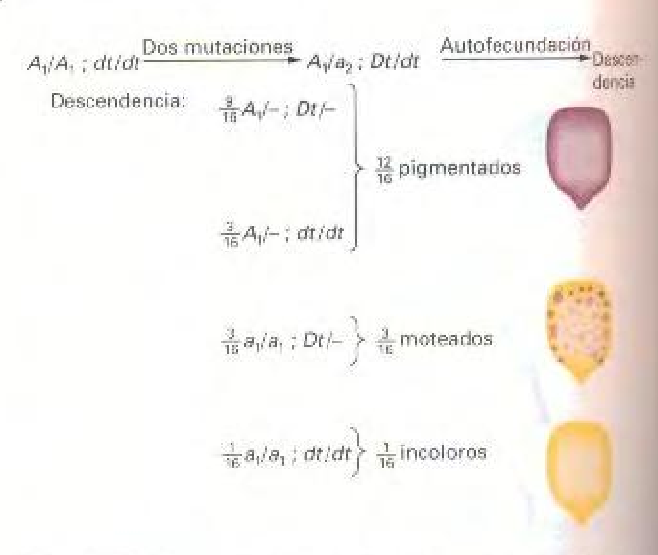


Figura 20-1. Explicación genética formal de la aparición del fenotipo moteado en el maíz. El genotipo A_1/a_1 ; Dt/dt se debe a las mutaciones simultáneas $A_1 \rightarrow a_1$ y $dt \rightarrow Dt$. Tras la autofecundación, este genotipo da lugar a la segregación 12:3:1 observada en los fenotipos de los granos.

del inglés *Dotted*). El efecto de *Dt* era producir motas pigmentadas en el fenotipo de a_1/a_1, por otra parte incoloro (Fig. 20-1). Por tanto, la línea original era con mucha probabilidad A_1/A_1 ; dt/dt, y las mutaciones dieron lugar a una planta A_1/a_1 ; Dt/dt, que tras la autopolinización produjo la segregación observada en la descendencia.

No obstante, ¿cuál era la causa del fenotipo moteado? Una posibilidad obvia podría ser una reversión de $a_1 \rightarrow A_1$ en las células somáticas, pero el gran número de motas en los granos *Dotted* requeriría una tasa de reversión extremadamente elevada. Empleando líneas especiales, Rhoades encontró anteras que mostraban manchas pigmentadas en las flores de plantas a_1/a_1

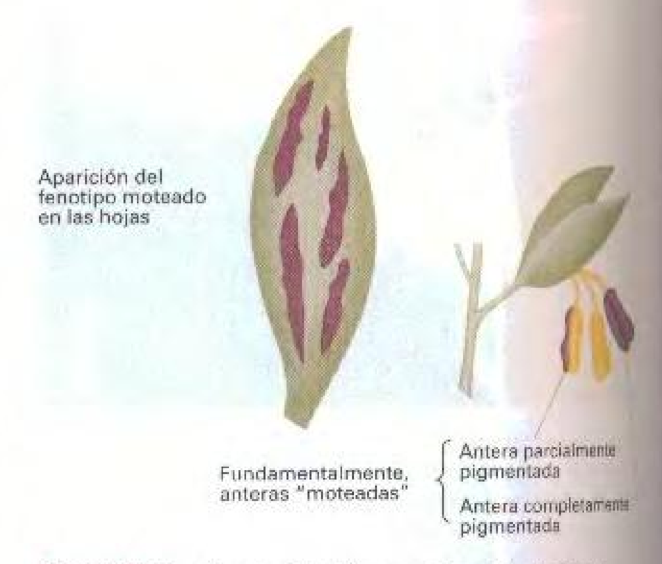


Figura 20-2. Rhoades utilizó líneas especiales de plantas de maíz a_1/a_1 ; Dt- portadoras de ciertos genes que permiten detectar sectores pigmentados en otros tejidos además de los granos. (Adaptado de M. M. Rhoades, *Genetics* 23, 1938, 382.)

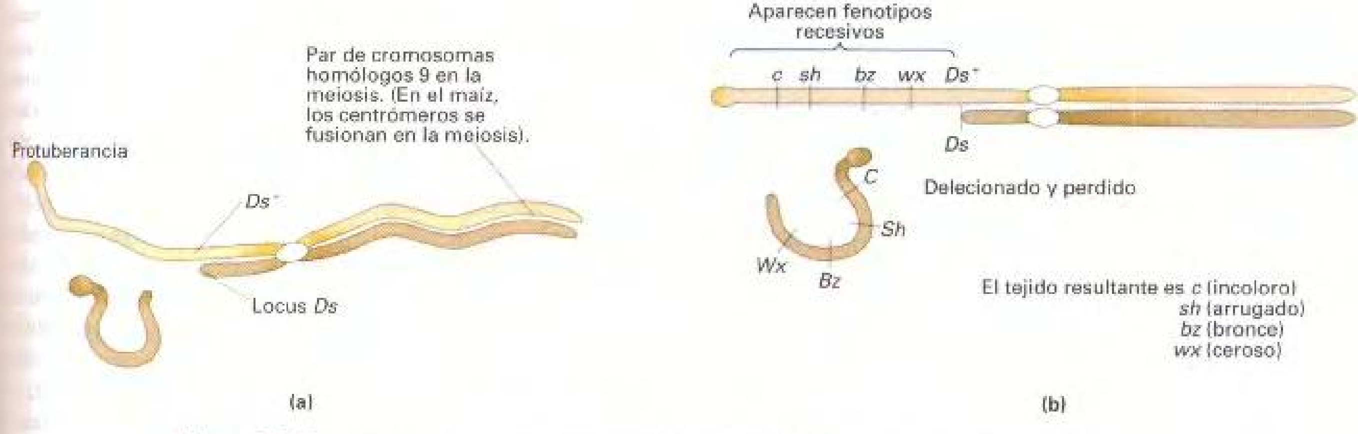


Figura 20-3. Detección de una rotura cromosómica (inestabilidad) debida a la acción del elemento *Ds* del maíz. (a) Detección citológica de la rotura. (Ds^+ indica la carencia de *Ds*). (b) Detección genética de la rotura.

Dt/– (Fig. 20-2). Su razonamiento fue que estas anteras podrían contener granos de polen que llevaban el genotipo revertido para el pigmento, de manera que utilizó el polen de dichas anteras para fertilizar flores femeninas de genotipo a_1/a_1 comprobado. En efecto, algunas plantas de la descendencia eran completamente pigmentadas, lo que indicaba que cada mota de las plantas parentales era, en realidad, la manifestación fenotípica de un hecho de reversión. Por tanto, a_1 es uno de los primeros casos conocidos de **alelo mutante inestable**, un alelo cuya mutación revierte a una tasa muy elevada. Sin embargo, la inestabilidad alélica depende de la presencia de un gen *Dt* no ligado. Una vez que se producen las reversiones, éstas son estables; el gen *Dt* puede ser eliminado de la línea sin que haya pérdida del carácter A_1. Este resultado no sería sorprendente si el fenotipo a_1 hubiera aparecido por la inserción de un elemento transponible defectuoso, que fuera incapaz de trasladarse por sí mismo. En cambio, en presencia de un factor *trans* producido por el locus *Dt*, el elemento podría moverse, produciendo la reversión hacia A_1. El alelo A_1 permanece estable en ausencia de *Dt*.

Experimentos de McClintock: el elemento *Ds*

En los años 50, Barbara McClintock demostró una situación análoga en otro estudio sobre el maíz. Encontró un factor genético *Ds* (*Disociación*) que daba lugar a una tendencia elevada hacia la rotura cromosómica en el lugar en el que se encontraba. Estas roturas pueden localizarse citológicamente (Fig. 20-3*a*), o genéticamente mediante la puesta en evidencia de alelos recesivos (Fig. 20-3*b*). Este comportamiento de *Ds* es otro tipo de inestabilidad. Una vez más, la inestabilidad depende de la presencia de un gen no ligado, *Ac* (*Activador*), de la misma forma que la inestabilidad de a_1 es dependiente de *Dt*.

McClintock encontró que resultaba imposible determinar la localización cromosómica de *Ac*. En algunas plantas, cartografiaba en una posición, y en otras plantas de la misma línea, aparecía en posiciones distintas. Por si fuera poco, el propio locus *Ds* (Fig. 20-3) cambiaba constantemente su posición en el brazo cromosómico, como indicaban los diferentes fenotipos de las secciones variegadas de las semillas (de acuerdo a la manifestación de las distintas combinaciones de alelos recesivos en un sistema como el que se ilustra en la Fig. 20-3*b*).

Los desplazamientos del elemento *Ds* adquieren un nuevo significado para nosotros en el contexto de este capítulo cuando se consideran los resultados del cruzamiento siguiente:

$$♂\ C\ Ds/C\ Ds\ ;\ Ac/Ac^-\ \times\ c\ Ds^+/c\ Ds^-\ ;\ Ac^-/Ac^+\ ♀$$

En este caso, *C* permite la expresión del color, y Ds^+ y Ac^- indican la ausencia del elemento correspondiente. La mayoría de las semillas de este cruzamiento fueron de las clases esperadas (Fig. 20-4), pero un grano excepcional resultó ser de gran interés. En la Figura 20-4, la primera semilla muestra el patrón normal de pigmentación completa debido a la presencia del alelo dominante *C*. La segunda semilla muestra un fondo con la misma pigmentación, aunque con las motas blancas esperadas de la pérdida del alelo *C* por rotura cromosómica en alguna de las



Figura 20-4. Resultados que indican la transposición de *Ds* al gen *C* del maíz. (*C* permite la expresión del color; *c* no la permite. *Ac* = activador). La acción de *Ds* es dependiente de la presencia del gen no ligado *Ac*.

líneas celulares de la semilla, con el resultado de la expresión del alelo *c*. Debido a la naturaleza clonal del incremento en el número de células de la semilla, el tamaño de una mancha blanca indica el momento en el que se produjo la rotura durante el desarrollo de la semilla. Un área blanca de pequeño tamaño sugiere que la rotura sucedió tarde en el desarrollo, porque tan sólo dio lugar a un número pequeño de células afectadas. Una mancha grande sugiere una rotura temprana, puesto que están afectadas muchas células descendientes. La semilla de la parte inferior de la Figura 20-4 indica la expresión de alelo *c* a partir de un momento muy inicial del desarrollo, ya que el fondo es blanco, no pigmentado. Sin embargo, la presencia de manchas pigmentadas en un fondo blanco sugiere la existencia de un proceso *reversible*, que permite que el alelo *C* vuelva a expresarse. La rotura cromosómica no podría explicar esta situación, puesto que tras la rotura, los alelos *C* quedarían en fragmentos acrocéntricos que se perderían durante la mitosis y, por lo tanto, el fenotipo blanco no revertiría. La coloración blanca de esta semilla parece ser el resultado de un segundo tipo de hecho en el que el gen *Ds* se transpone al alelo *C*, eliminando su función, aunque sin inducir la rotura cromosómica. Si el alelo *Ds* se escinde y se transpone a otro lugar, el alelo *C* recupera su función, dando lugar a las células pigmentadas que forman las manchas. Para ello, se requiere el alelo *Ac*; aunque, en este caso, tiene el efecto de mediar la inestabilidad reversible del locus *C*. Si *Ac* se elimina de la línea mediante cruzamientos, el alelo c^u pasa a ser una mutación estable.

La analogía de este sistema con el *a, Dt* es obvia. Quizás la primera situación se debe también a la inserción de un elemento similar al *Ds* en el gen A_1. Es lógico preguntarse si a_1 responderá a *Ac* o si c^u lo hará a *Dt*. La respuesta es no; algún tipo de especificidad impide esta activación cruzada de la inestabilidad mutacional.

El locus *wx* (*waxy*)

El elemento *Ds* puede desplazarse no sólo al gen *Ds*, sino también a otros genes, convirtiéndolos en mutantes inestables dependientes de *Ac*. Uno de estos locus, *wx* (*waxy*), ha sido objeto de un intenso estudio sobre los efectos del elemento *Ds*. Oliver Nelson emparejó muchos alelos *waxy* inestables en ausencia de la mutación *Ac*. Entre estos heterocigotos wx^{m-1}/wx^{m-2}, buscó los recombinantes silvestres *Wx* poco frecuentes, mediante tinción del polen con el reactivo $KI\text{-}I_2$, que tiñe de negro el polen *Wx* y de rojo el *wx*. Calculando la frecuencia de los granos de polen *Wx* en cada tipo de heterocigoto, Nelson realizó la cartografía por recombinación de la estructura fina del gen *waxy*. Demostró que los distintos alelos mutantes «*waxy* mutables» se debían, de hecho, a la inserción del elemento *Ds* en diferentes posiciones del gen. Continuando el experimento, permitió que el polen poco frecuente portador del alelo *Wx* fertilizara plantas *wx* y produjera granos *Wx*, que pudieron detectarse mediante tinción de astillas cortadas. Los granos *Wx* se desarrollaron en plantas, y el intercambio de marcadores flanqueantes, detectado por la expresión de éstos en la planta adulta, demostró que los granos de polen *Wx* se habían originado por intercambio cromosómico.

Características generales de los elementos controladores

En la actualidad, sabemos de la existencia de varios sistemas como el a_1-*Dt* y el *Ds-Ac*. Cada uno de ellos muestra una acción similar, con un **gen diana** que es inactivado, según cabe presumir, por la inserción de algún **elemento receptor**, y un **elemento regulador** distante que mantiene la inestabilidad mutacional del locus, probablemente a través de su capacidad para «descolgar» al elemento receptor del locus diana y restaurar la función normal del gen.

En los ejemplos discutidos hasta ahora, decimos del alelo inestable que es **no autónomo**: puede revertir sólo en presencia del regulador. A veces, sin embargo, un sistema como el *Ac-Ds* puede producir un alelo inestable que es **autónomo**. Dichos mutantes se reconocen porque muestran proporciones mendelianas (como 3:1 de pigmentado a moteado) que, en apariencia, son independientes de cualquier otro elemento. De hecho, estos alelos parecen haberse producido por la inserción del propio *Ac*

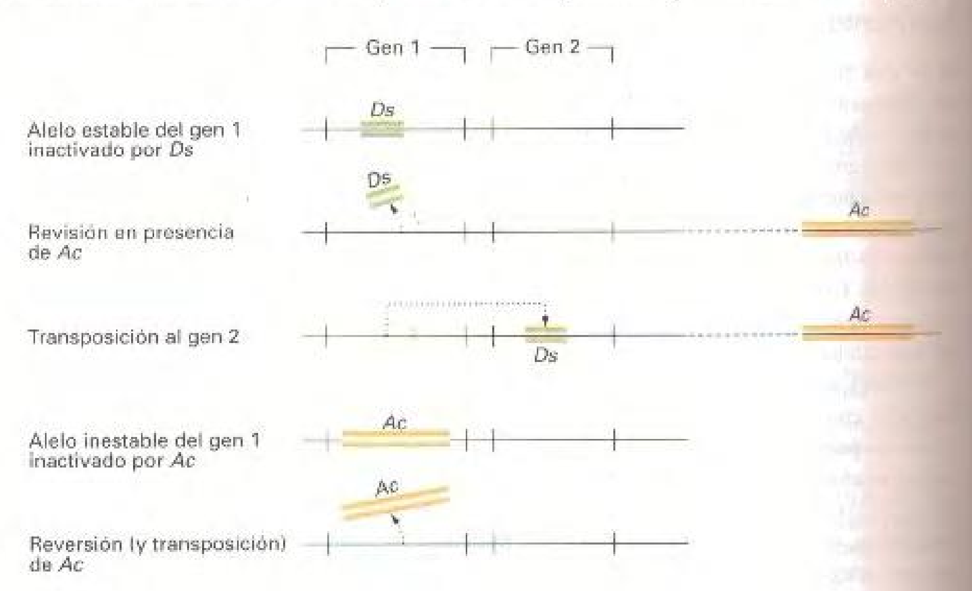


Figura 20-5. Resumen de los principales efectos de los elementos controladores del maíz. *Ac* y *Ds* se utilizan como ejemplos, actuando sobre dos genes hipotéticos 1 y 2.

centro del gen diana. Un alelo de este tipo puede transformarse posteriormente en uno no autónomo. En tales casos, la no autonomía parece ser el resultado de la generación espontánea de un elemento *Ds* a partir del elemento *Ac* insertado. En otras palabras, *Ds* es con toda probabilidad una versión incompleta del mismo *Ac*.

La Figura 20-5 resume el comportamiento global de los elementos controladores del maíz, tal y como se infiere de los datos genéticos. Observe que este modelo explica elegantemente los hechos mutacionales que dieron lugar a la segregación original de Rhoades: se genera un elemento no autónomo similar a *Ds* a partir de un elemento similar a *Ac*; la transposición del elemento similar a *Ds* al gen A_1 da lugar a un alelo a_1 inactivo, aunque mutacionalmente inestable. Los estudios moleculares efectuados en los últimos años sobre *Ac*, *Ds* y otros elementos controladores del maíz han confirmado el modelo genético de McClintock.

COROLARIO

Los elementos controladores del maíz pueden inactivar el gen en el que residen, producir roturas cromosómicas y transponerse a sitios nuevos en el genoma. Los elementos completos realizan estas funciones por sí solos; otras formas con deleciones parciales pueden transponerse sólo con la ayuda de un elemento completo situado en otra parte del genoma. Las Figuras 20-6 y 20-7 muestran ejemplos de los efectos de los transposones en el maíz y efectos similares en la planta boca de dragón.



Figura 20-6. Mosaicismo en el maíz debido a mutagénesis con un transposón. Estas semillas corresponden a genotipos en los que el transposón está insertado en un gen implicado en la producción de antocianina. Por lo tanto, la mayoría de las células de estas semillas carecen de antocianina y son amarillas; este genotipo lo denominaremos A'/A'. Sin embargo, en ocasiones, el transposón sale del gen en el transcurso del desarrollo, dando lugar a una célula revertiente de genotipo A/A'. Tras varias divisiones celulares, se formará un clon de células revertientes y, por tanto, una mancha de células pigmentadas. Las tres filas de semillas representan líneas en las que el transposón sale del gen en un período temprano (manchas grandes), tardío (manchas pequeñas) o intermedio (manchas de tamaño intermedio). (Anthony Griffiths.)



Figura 20-7. Mosaicismo en boca de dragón (*Antirrhinum majus*) debido a mutagénesis con un transposón. Como en el ejemplo del maíz (Fig. 20-6), la planta tiene las dos copias de un gen implicado en la síntesis de antocianinas inactivadas por la inserción de un transposón. Los sectores revertientes (manchas o bandas rojas) se producen cuando el transposón sale de manera espontánea del gen. (Fotografía de Rosemary Carpenter y Enrico Coen.)

Secuencias de inserción bacterianas

Actualmente, se sabe que las **secuencias de inserción** o **elementos de secuencia de inserción (IS)** son segmentos de DNA bacteriano que se pueden mover de una posición a otra del mismo cromosoma o a un cromosoma distinto. Cuando los elementos IS se sitúan dentro de los genes, interrumpen la secuencia cifradora e inactivan la expresión del gen. Debido a su tamaño y a que algunos de ellos contienen señales terminadoras de la transcripción y traducción, los elementos IS pueden bloquear la expresión de otros genes del mismo operón que se encuentren aguas abajo del promotor del policistrón. Los elementos IS se encontraron por primera vez en el operón *gal* de *E. coli* —un grupo de tres genes implicados en el metabolismo del azúcar galactosa.

Demostración física de la inserción de DNA

Recuerde que el fago λ se integra en una posición cercana al operón *gal* y resulta bastante simple la obtención de partículas fágicas $\lambda dgal$, que han adquirido la región *gal* (pág. 229). Cuando los fagos $\lambda dgal$ incorporan las mutaciones generadas por IS en la región *gal* y se comparan sus densidades de flotación en un gradiente de cloruro de cesio (CsCl) con la de los fagos $\lambda dgal$ normales, resulta evidente que el DNA que contiene la mutación IS es más largo que el DNA silvestre. Este experimento demuestra claramente que las mutaciones se han producido por la inserción de una cantidad significativa de DNA en el operón *gal*. La Figura 20-8 muestra este experimento con más detalle.

Visualización directa del DNA insertado

Cuando se hibrida el DNA desnaturalizado de $\lambda dgal$ que contiene la mutación por inserción con el DNA desnaturalizado de $\lambda dgal$ silvestre, el trozo extra de DNA se puede observar al microscopio electrónico. En estos experimentos, algunas de las moléculas que se forman en la mezcla no son las dobles hélices originales, sino heterodúplices constituidos por una cadena mutante y otra silvestre. Cuando se analizan mutaciones puntuales,

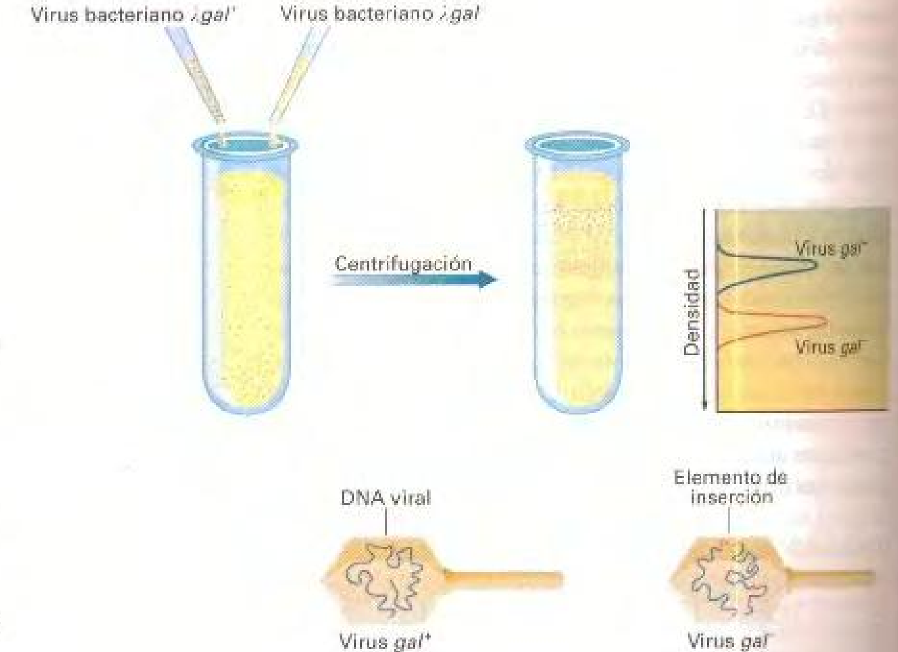


Figura 20-8. La mutación por inserción se demuestra con partículas del fago λ que contienen el alelo bacteriano para la utilización de la galactosa (*gal*⁺) o el alelo mutante (*gal*⁻). Los virus se centrifugan en una solución de cloruro de cesio. Las partículas *gal*⁻ son más densas. Puesto que todas las partículas virales tienen el mismo volumen y sus envueltas externas tienen la misma masa, la mayor densidad de las partículas *gal*⁻ demuestra que deben contener una molécula de DNA más grande. (Tomado de S. M. Cohen y J. A. Shapiro, «Transposable Genetic Elements.» Copyright © 1980 de Scientific American Inc. Reservados todos los derechos.)

los heterodúplices son indistinguibles de las moléculas parentales de DNA. Sin embargo, en el caso del DNA que contiene las mutaciones IS, cada heterodúplice muestra un bucle de cadena sencilla, o lazo (Fig. 20-9). Este bucle de cadena sencilla confirma la presencia de una secuencia insertada en el DNA mutado que no tiene secuencia complementaria en el DNA silvestre. La longitud de este lazo de cadena sencilla se puede calcular mediante la adición de un marcador de DNA estándar en la preparación, comprobándose que es de 800 nucleótidos, aproximadamente.

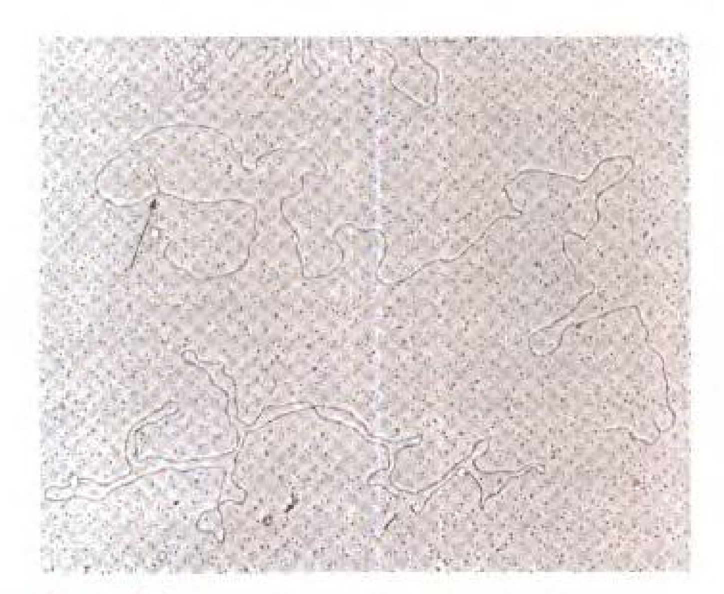


Figura 20-9. Micrografía electrónica de un DNA heterodúplice *λdgal*⁺/*λdgal*ᵐ. El bucle de cadena sencilla (flecha) se debe a la presencia de una secuencia de inserción en *λdgal*ᵐ. (Tomado de A. Ahmed y D. Scraba, «The Nature of the *gal3* Mutation of *Escherichia coli*», *Molecular and General Genetics* 136, 1975, 233.)

Identificación de elementos IS discretos

¿Son los segmentos de DNA que se insertan en los genes simplemente fragmentos aleatorios de DNA o son entidades genéticas definidas? Los experimentos de hibridación muestran que muchas mutaciones por inserción diferentes se deben a un conjunto pequeño de secuencias de inserción. En estos experimentos, se aíslan fagos *λdgal* que contienen el alelo *gal*⁻ a partir de bacterias mutantes por inserción del elemento IS, y sus DNA se utilizan para sintetizar RNA radiactivo *in vitro*. Ciertos fragmentos de este RNA hibridan con el DNA mutante, pero no con el DNA silvestre, dato indicativo de que el mutante contiene un trozo extra de DNA. Estos fragmentos particulares de RNA hibridan también con el DNA de otros mutantes IS, lo cual demuestra que el mismo trozo de DNA se inserta en sitios distintos en los diferentes mutantes IS.

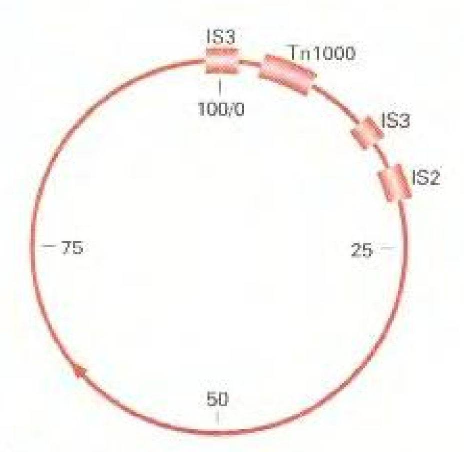
Basándose en sus patrones de hibridación cruzada, los mutantes por inserción se distribuyen en categorías. La primera secuencia, el segmento de 800 pb identificado en *gal*, se denomina *IS1*. Una segunda secuencia, denominada *IS2*, tiene una longitud de 1350 pb. El Cuadro 20-1 enumera algunas de las secuencias de inserción y sus tamaños. Las repeticiones invertidas que se muestran en el Cuadro 20-1 las trataremos brevemente en el apartado *Transposones*.

Actualmente, sabemos que el genoma de la estirpe silvestre de *E. coli* es rico en elementos IS: contiene ocho copias de IS1, cinco copias de IS2 y copias de otros tipos de IS no tan bien estudiados. Sería conveniente subrayar que la aparición repentina de una secuencia de inserción en cualquier locus en estudio significa que estos elementos son verdaderamente móviles, con capacidad para transponerse por todo el genoma. Presumiblemente, producen una mutación o alguna otra alteración detectable de la función celular normal sólo cuando acaban introduciéndose en una posición «anormal», como es dentro de un gen estructural. Las se-

CUADRO 20-1. Elementos de inserción procarióticos

Secuencia de inserción	Número normal de copias en *E. coli*	Longitud (pb)	Repetición invertida* (pb)
IS1	5-8 copias en el cromosoma	768	18/23
IS2	5 copias en el cromosoma; 1 en el factor F	1327	32/41
IS3	5 copias en el cromosoma; 2 en el factor F	1400	32/38
IS4	1 ó 2 copias en el cromosoma	1400	16/18
IS5	Desconocido	1250	Corta
γδ (TN1000)	1 o más copias en el cromosoma; 1 en el factor F	5700	35
Segmento pSC101	En el plásmido pSC101	200	30/36

* Fracción de pares de bases: por ejemplo 18 de 23, y así sucesivamente.
Fuente: M. P. Calos y J. H. Miller, *Cell* 20, 1980, 579-595.



igura 20-10. Mapa genético y físico del factor F. Se muestran las ...ciones de las secuencias de inserción localizadas en el plásmido, IS2, IS3 y ...1000 (rectángulos), respecto a las coordenadas 0-100 del mapa. La flecha ...a el origen y la dirección de la transferencia del DNA del factor ...rante la conjugación.

...encias de inserción aparecen también con frecuencia en el fac-...or F. La Figura 20-10 muestra un ejemplo de un plásmido F-*lac*.

OROLARIO

El genoma bacteriano contiene segmentos de DNA, ...enominados elementos IS, que pueden moverse de una ...osición a otra diferente del mismo cromosoma o de un ...romosoma distinto.

...rientación de los elementos IS

...ebido a su secuencia de bases, las dos cadenas del DNA de ...*dgal*" tienen densidades de flotación diferentes. Tras la desnaturalización del DNA y su ultracentrifugación, se pueden recoger ambas cadenas por separado. En algunos casos, las *mismas* cadenas (las cadenas paralelas, por ejemplo) de dos mutantes IS1 distintos forman entre ellas un híbrido inesperado. Estos híbridos tienen un aspecto peculiar al microscopio electrónico: cada uno de ellos está formado por una región de doble cadena con cuatro colas de cadena sencilla (Fig. 20-11). Esta observación se explica si suponemos que los elementos IS1 están insertados en direcciones opuestas en los dos mutantes (Fig. 20-12).

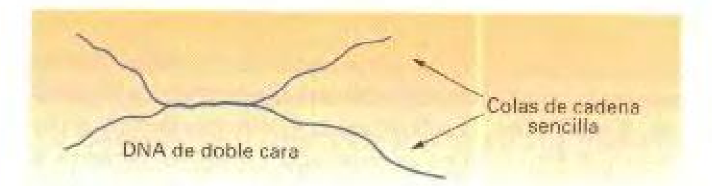


Figura 20-11. Representación esquemática del aspecto de una molécula de DNA heterodúplice formada por la hibridación de las cadenas correspondientes (es decir, las cadenas que tienen la misma secuencia de bases, a excepción del sitio de la IS) de los DNA *λdgal*" de dos mutantes concretos producidos por secuencias de inserción. Esta hibridación inesperada entre las cadenas correspondientes (que tienen normalmente la misma secuencia de bases y no la complementaria) se puede explicar con el modelo mostrado en la Figura 20-12.

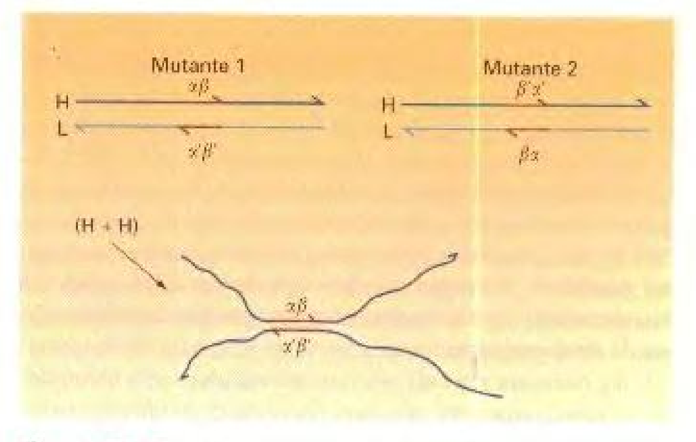


Figura 20-12. Modelo que explica la estructura del DNA heterodúplice mostrado en la Figura 20-11. Las líneas granates representan al elemento IS1; α y β representan los extremos de la molécula IS1; H y L representan las cadenas de DNA de *λdgal* con alta y baja densidad de flotación, respectivamente. El híbrido se puede explicar asumiendo que la secuencia IS1 se ha insertado en direcciones opuestas en los dos mutantes.

Transposones procarióticos

En los años 50, se descubrió en los hospitales japoneses una propiedad aterradora de las bacterias patógenas. La disentería bacteriana se debe a bacterias del género *Shigella*. Inicialmente, se comprobó que esta bacteria era sensible a una amplia gama de antibióticos, que se emplearon para controlar la enfermedad. Sin embargo, en los hospitales japoneses, la estirpe de *Shigella* ais-

CUADRO 20-2. Determinantes genéticos presentes en los plásmidos

Características	Ejemplos de plásmidos
Fertilidad	F, R1, Col
Producción de bacteriocinas	Col E1
Resistencia a metales pesados	R6
Producción de enterotoxinas	Ent
Metabolismo del alcanfor	Cam
Tumorigenicidad en las plantas	Ti (en *Agrobacterium tumefaciens*)

lada de pacientes con disentería resultó ser resistente simultáneamente a muchos de estos fármacos, que incluyen a la penicilina, la tetraciclina, la sulfanilamida, la estreptomicina y el cloranfenicol. Este fenotipo de resistencia a múltiples fármacos se heredaba como un paquete genético único y podía transmitirse de forma infecciosa, no sólo a otras estirpes sensibles de *Shigella*, sino también a otras especies bacterianas relacionadas. Esta propiedad resulta extraordinariamente útil para la bacteria patógena y sus repercusiones para la ciencia médica fueron terribles. Desde el punto de vista del genetista, sin embargo, la situación es muy interesante. El vector que transportaba estas resistencias de una célula a otra resultó ser un plásmido similar al factor F. Estos **factores R** (de resistencia) se transfieren rápidamente de una célula a otra por conjugación, al igual que ocurre con el factor F en *E. coli* (Cap. 7).

De hecho, estos factores R fueron sólo los primeros de muchos factores similares a F que se descubrieron. Se ha descubierto que estos elementos, que aparecen en el citoplasma en forma de plásmidos, llevan muchos tipos diferentes de genes bacterianos. El Cuadro 20-2 enumera sólo algunas de las características que pueden transportar los plásmidos. ¿Cuál es el modo de acción de estos plásmidos? ¿Cómo adquieren sus nuevas propiedades genéticas? ¿Cómo las transfieren desde una célula a otra? El descubrimiento de los *transposones* hizo posible contestar algunas de estas preguntas.

Estructura física de los transposones

Si se desnaturaliza el DNA de un plásmido que confiere resistencia a fármacos (que lleva los genes que confieren resistencia a la kanamicina, por ejemplo), para dar formas de cadena sencilla, y se deja renaturalizar lentamente, algunas de las cadenas adoptan formas inusuales al microscopio electrónico: un gran anillo de DNA circular se une a una estructura con forma de «piruleta» (Fig. 20-13). El «palo» de la piruleta está constituido por DNA de doble cadena, que se ha formado por el emparejamiento de **secuencias repetidas invertidas (IR)** en el plásmido (Fig. 20-14). Estudios posteriores han demostrado que, en muchos casos, las secuencias IR son un par de elementos IS. Por ejemplo, IS10 está presente en los extremos de la región que lleva los genes de resistencia a la tetraciclina (Fig. 20-15). En algunos casos, sin embargo, las secuencias IR son mucho menores.

Los genes de resistencia a fármacos u otras propiedades genéticas llevadas por los plásmidos se localizan entre las secuencias



Figura 20-13. Estructura peculiar que se forma al reasociarse el DNA desnaturalizado de un plásmido. La región IR de doble cadena separa un gran lazo circular del pequeño lazo en forma de «piruleta». (Fotografía cortesía de S. N. Cohen.)

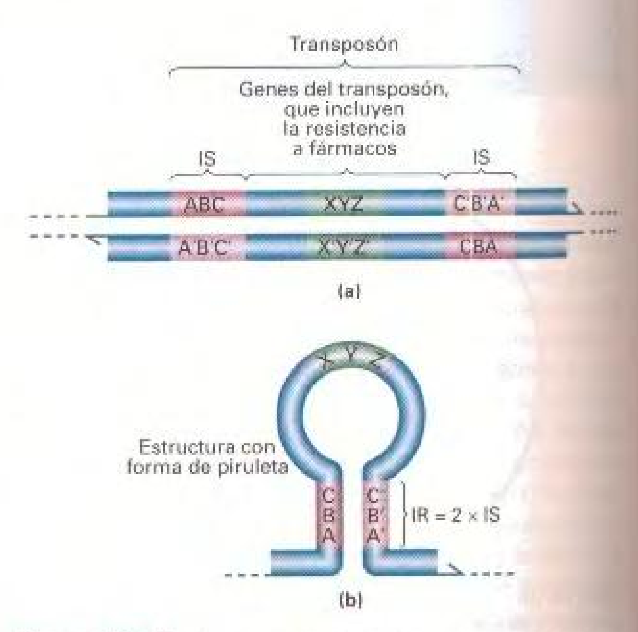


Figura 20-14. Explicación molecular de la estructura con forma de piruleta vista en la Figura 20-13. La estructura se denomina *transposón*. (a) Transposón en su forma de doble cadena antes de la desnaturalización. Obsérvese la presencia de dos copias con orientaciones opuestas de una secuencia de inserción (IS). (b) Estructura en piruleta formada por el apareamiento intracatenario después de la desnaturalización. Las dos regiones IS hibridan para formar la repetición invertida (IR) del transposón; los genes del transposón se encuentran en el lazo de la piruleta.

IR, en la «cabeza de la piruleta». Las secuencias IR junto a los genes contenidos entre ellas se han denominado colectivamente **transposón (Tn)**. (Por lo tanto, los transposones son más largos que los elementos IS, ya que contienen genes extra que determinan proteínas). El resto del plásmido, que contiene genes que determinan funciones de transferencia de la resistencia (RTF, del inglés *Resistance-Transfer Function*), recibe la denominación de **región RTF** (Fig. 20-16). El Cuadro 20-3 muestra algunos de los transposones conocidos.

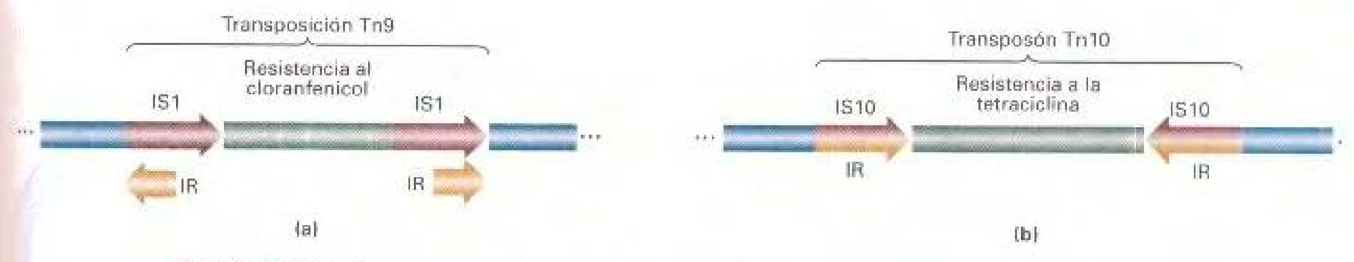


Figura 20-15. Dos transposones distintos que tienen regiones IR diferentes y llevan genes de resistencia a fármacos diferentes. (a) Tn9 posee una región IR pequeña, porque los dos elementos IS1 están en la misma orientación y cada uno de los IS1 tiene una repetición invertida corta. (b) Tn10 presenta una región IR grande porque los dos componentes IS10 tienen orientaciones opuestas y toda la secuencia de IS10 constituye la IR.

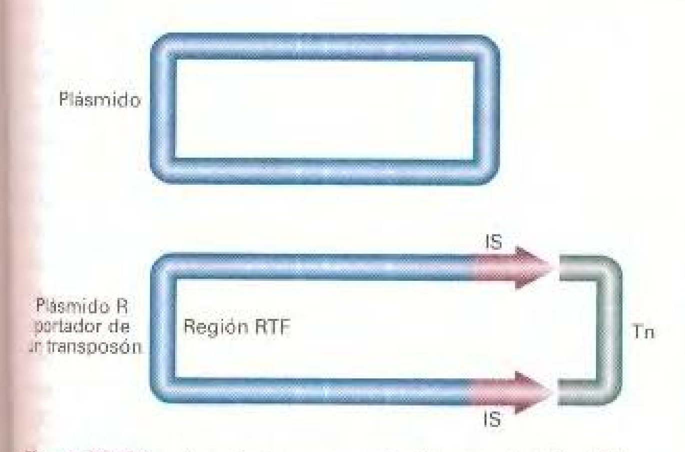


Figura 20-16. Inserción de un transposón (Tn) en un plásmido. RTF representa los genes funcionales del plásmido para la transferencia de la resistencia. Tn incluye los elementos IS y los genes de resistencia a fármacos.

CUADRO 20-3. **Algunos transposones procarióticos**

Transposón	Marcador	Longitud (pb)	Repetición invertida
Tn1	Ampicilina	4957	38
Tn2	Ampicilina		
Tn3	Ampicilina		
Tn4	Ampicilina, estreptomicina, sulfanilamida	20 500	Corta
Tn5	Kanamicina	5400	1500
Tn6	Kanamicina	4200	No detectable con el microscopio electrónico
Tn7	Trimetoprima, estreptomicina	14 000	No detectable con el microscopio electrónico
Tn9	Cloranfenicol	2638	18/23*
Tn10	Tetraciclina	9300	1400

* 18 a 23 pares de bases.
Fuente: M. P. Calos y J. H. Miller, *Cell* 20, 1980, 579-595.

Desplazamiento de los transposones

Un transposón puede saltar desde un plásmido a un cromosoma bacteriano o a otro plásmido. De esta forma, se generan plásmidos con múltiples resistencias a fármacos. La Figura 20-17 es un diagrama de un plásmido R, que indica los diferentes sitios en los que se pueden localizar los transposones.

COROLARIO

Los transposones se detectaron originalmente como elementos genéticos móviles que conferían resistencia a fármacos. Muchos de estos elementos contienen elementos IS reconocibles flanqueando un gen que determina la resistencia al fármaco. Los elementos IS y los transposones se agrupan ahora bajo la denominación única de *elementos transponibles*.

El fago mu

El fago mu es un fago de apariencia normal. Lo mencionamos en este capítulo porque, aunque se trata de un virus verdadero, tiene muchas características en común con los elementos IS. El DNA de doble hélice de este fago tiene un tamaño de 36 000 pb, mucho más largo que un elemento IS. Sin embargo, parece capaz de insertarse en cualquier lugar del genoma de una bacteria o en un plásmido y en cualquier orientación. Una vez insertado, produce una mutación en el locus de inserción, de nuevo como un elemento IS. (La denominación del fago se debió a esta propiedad: *mu* significa «mutador»). Normalmente, estas mutaciones no se pueden revertir, aunque se puede producir la reversión mediante ciertas manipulaciones genéticas. Cuando ocurre esto, los fagos que se recuperan no muestran deleción alguna, lo que demuestra que la escisión es exacta y que, por tanto, la inserción del fago no implica ninguna pérdida de material de éste.

El genoma de cada fago maduro presenta un trozo de DNA de su hospedador previo, flanqueándolo en cada extremo (Fig. 20-18). Sin embargo, este DNA no se inserta de nuevo en el siguiente hospedador; y su función no está clara. El fago mu tiene también una secuencia IR, pero ninguno de los elementos repetidos se encuentra en un extremo.

Mu puede actuar también como un acoplador genético, movilizando cualquier clase de DNA y transponiéndolo a cualquier lugar del genoma. Por ejemplo, puede movilizar a otro fago (como λ) o al factor F. En tales situaciones, el DNA insertado

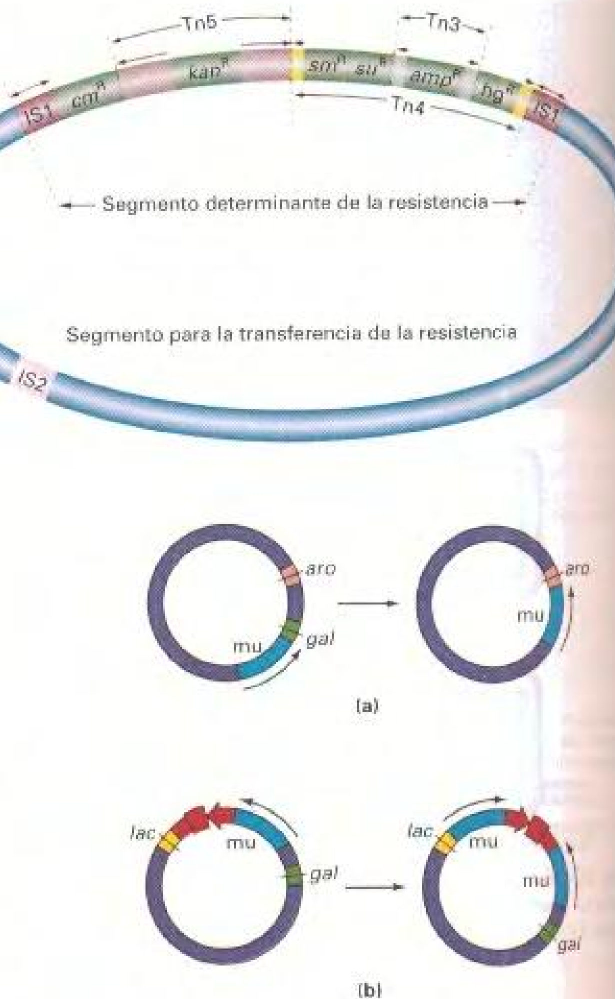


Figura 20-17. El papel de los elementos transponibles en la evolución de los plásmidos con resistencia a antibióticos se ilustra con un mapa esquemático de un plásmido que contiene muchos genes de resistencia. El plásmido parece haberse formado por la unión de un segmento determinante de la resistencia y un segmento para la transferencia de la resistencia; en las uniones hay elementos de inserción (IS1), donde los dos segmentos a veces se disocian de manera reversible. Los genes que determinan resistencia al mercurio (*Hg*^{R}), y a los antibióticos cloranfenicol (*cm*^{R}), kanamicina (*kan*^{R}), estreptomicina (*sm*^{R}), sulfonamida (*su*^{R}) y ampicilina (*amp*^{R}) se agrupan en el segmento determinante de la resistencia, que consta de múltiples elementos transponibles; las repeticiones invertidas terminales se indican con flechas que apuntan hacia fuera del elemento. En el segmento para la transferencia de la resistencia hay un transposón que determina resistencia a la tetraciclina (*tet*^{R}). El transposón Tn3 está situado dentro del Tn4. Cada transposón se puede transferir independientemente. (Tomado de S. N. Cohen y J. A Shapiro, «Transposable Genetic Elements». Copyright © 1980 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)



Figura 20-18. El DNA de un fago mu libre tiene colas que provienen de su hospedador anterior. (Tomado de S. N. Cohen y J. A Shapiro, «Transposable Genetic Elements». Copyright © 1980 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)



Figura 20-19. El fago mu puede intervenir en la inserción del fago λ en el cromosoma bacteriano, dando lugar a una estructura como la que se muestra en la figura.

Figura 20-21. El fago mu puede producir la deleción o la inversión de los segmentos bacterianos adyacentes. (a) Deleción de la región *gal* por la transposición del fago mu. (b) La región del factor F de una estirpe Hfr se invierte por la transposición del fago mu.

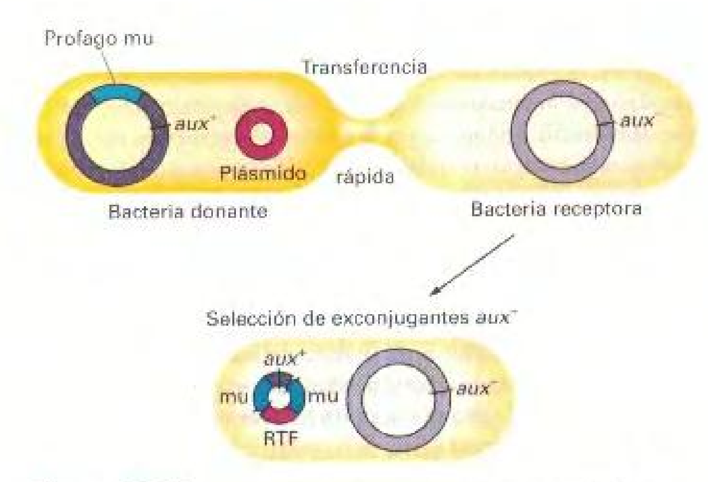


Figura 20-20. El fago mu puede intervenir en la transposición de un gen bacteriano a un plásmido. El procedimiento de selección para la detección de la transposición se indica en la figura. Un alelo mutante que confiere auxotrofia se indica con *aux*$^-$.

queda flanqueado por dos genomas de mu (Fig. 20-19). Puede transferir también marcadores bacterianos a un plásmido; en este caso, de nuevo, la región transferida está flanqueada por un par de genomas de mu (Fig. 20-20). Finalmente, el fago mu puede mediar en varias clases de reorganizaciones cromosómicas estructurales (Fig. 20-21).

Mecanismos de transposición en los procariotas

Los elementos transponibles de los procariotas emplean varios mecanismos de transposición distintos. Y, como veremos más adelante, los elementos eucarióticos muestran además mecanismos adicionales de transposición.

En *E. coli*, podemos identificar formas de transposición **replicativa** y **conservativa** (no replicativa). En la ruta replicativa se genera una nueva copia del elemento transponible durante la transposición. El resultado es la aparición de una copia en el

nuevo sitio, manteniéndose la otra copia en el sitio original. En la ruta conservativa, no se produce replicación. En su lugar, el elemento se escinde del cromosoma o plásmido y se integra en el nuevo sitio.

Transposición replicativa

Cuando, en ciertos transposones, se produce una transposición desde un locus a otro, queda una copia del elemento transponible en el locus original. El análisis de transposones mutantes reveló un hecho interesante sobre el mecanismo de transposición. Empleando el transposón Tn3 (Fig. 20-22), los investigadores agruparon las mutaciones que impedían la transposición en dos categorías. Una clase de mutaciones recesivas en *trans* se localiza en el gen que determina la enzima transposasa, catalizadora de la transposición. Una segunda clase de mutaciones dominantes en *cis* conducen a la formación de un intermediario del proceso de transposición. La Figura 20-23 representa la ruta de transposición de Tn3 desde un plásmido a otro. El intermediario es un plásmido doble, formado por la fusión de los plásmidos donante y recipiente. El círculo combinado que resulta de la fusión de los dos elementos circulares recibe la denominación de **cointegrado**. Por lo visto, las mutaciones de esta segunda clase delecionan una región del transposón en la cual se produce un hecho de recombinación que resuelve el cointegrado en dos círculos más pequeños. Esta región, denominada **sitio interno de resolución** (**IRS**, del inglés *Internal Resolution Site*), se muestra en la Figura 20-22.

El descubrimiento de la estructura del cointegrado como un intermediario de la transposición ayudó al establecimiento del modelo de transposición replicativa para ciertos elementos. Observe en la Figura 20-23 cómo se duplica el elemento transponible durante la fusión y cómo el hecho de recombinación que resuelve el cointegrado en dos círculos más pequeños deja una copia del elemento transponible en cada plásmido.

Transposición conservativa

Algunos transposones, como el Tn10, se escinden del cromosoma y se integran en el DNA diana. En estos casos, no se produce la replicación del DNA del elemento y éste se pierde del sitio original del cromosoma. Los investigadores demostraron esta ausencia de replicación mediante la construcción de heterodúplices de derivados de λTn10 que contenían la región *lac* de *E. coli*. Emplearon DNA de los derivados Tn10-*lacZ*$^+$ y Tn10-*lacZ*$^-$. Los heterodúplices, por tanto, contienen una cadena con la región *lac* silvestre (Z$^+$) y la otra con la región *lac* mutada (Z$^-$). La Figura 20-24 representa esta parte del experimento. El DNA heterodúplice se utiliza para infectar células que no tienen los genes *lac*, seleccionándose las transposiciones de Tn10, que confieren resistencia a la tetraciclina. Se originan diferentes tipos de colonias por la transposición de un transposón portador de un heterodúplice Z$^-$/Z$^+$ (Fig. 20-25). Si hubiera replicación (transposición replicativa), todas las colonias serían completamente Lac$^+$ o completamente Lac$^-$, puesto que la replicación habría convertido el DNA heterodúplice en dos moléculas hijas homodúplices. El mecanismo mediante el que se produce esta conversión se examinará en detalle en la siguiente sección. Sin embargo, si la transposición fuera conservativa y no incluyera replicación, cada colonia se originaría a partir de un heterodúplice *lacZ*$^+$/*lacZ*$^-$; y tales colonias serían parcialmente Lac$^+$ y parcialmente Lac$^-$. Utilizando medios que tiñen las células Lac$^+$ y Lac$^-$ de colores diferentes, se pueden observar sectores Lac$^+$ y Lac$^-$ en las colonias.

Por lo tanto, la determinación del tipo de transposición de Tn10, replicativa o conservativa, se puede realizar observando si se producen sectores coloreados dentro de la misma colonia que resulta de la transposición. En la mayoría de los casos se obser-



Figura 20-22. Estructura de Tn3. Tn3 tiene 4957 pares de bases y codifica tres polipéptidos: la transposasa se requiere para la transposición, el represor es una proteína que regula al gen de la transposasa (véase el Cap. 11) y la β-lactamasa confiere resistencia a la ampicilina. Tn3 está flanqueado por repeticiones invertidas (IR) de 30 pares de bases y presenta un sitio, denominado *sitio interno de resolución*, necesario para la resolución de los cointegrados de Tn3.

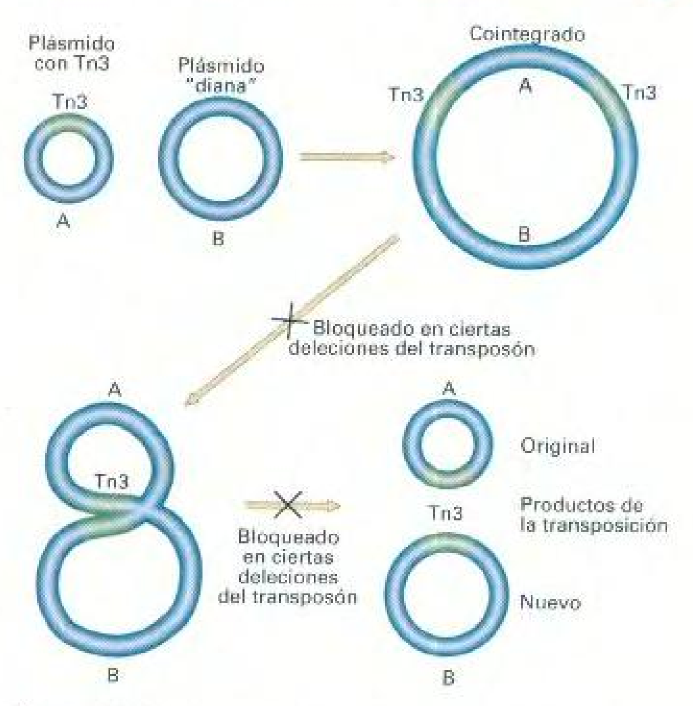


Figura 20-23. La transposición de Tn3 tiene lugar mediante la formación de un cointegrado intermediario. Los cointegrados de la transposición de Tn3 se observan en los casos de algunas deleciones internas del transposón. La explicación correcta de esta observación es que los cointegrados son intermediarios de la transposición de Tn3 y que su resolución está bloqueada debido a que la deleción ha eliminado el sitio interno de resolución, donde tiene lugar la recombinación. (Tomado de S. N. Cohen y J. A Shapiro, «Transposable Genetic Elements». Copyright © 1980 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

Z^+
Tn10
+
Z^-
Pares de bases diferentes
Desnaturalización
Reasociación
Heterodúplice y Homodúplice

Figura 20-24. Generación de elementos Tn10 heterodúplice y homodúplice. La desnaturalización y reasociación de una mezcla de dos fagos λ parentales portadores de elementos Tn10 que difieren sólo en tres bases del transposón da lugar a una mezcla de productos heterodúplices y homodúplices. La diferencia de bases en el gen Z permite la determinación de la naturaleza heterodúplice u homodúplice de una célula que ha recibido el gen Z mediante transposición. (Adaptado de J. Bender y N. Kleckner, *Cell* 45, 1986, 801-815.)

Donante
Diana
Transposición conservativa (no replicativa)
Transposición replicativa
(a)

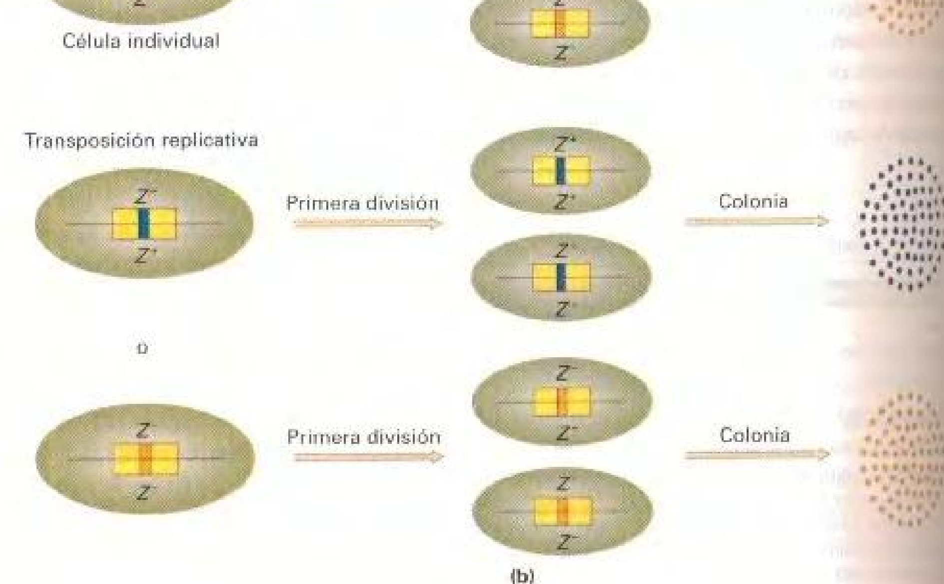


Figura 20-25. Consecuencias de la transposición replicativa y conservativa. (a) La naturaleza heterodúplice u homodúplice del DNA (véase la Fig. 20-24) se transpone al gen diana. Si el DNA es inicialmente un heterodúplice, el DNA resultante de la transposición seguirá siendo heterodúplice sólo en una ruta conservativa o no replicativa. (b) Puesto que la transposición del heterodúplice da lugar a una célula que en la ruta conservativa mantiene la naturaleza heterodúplice del DNA, aparecerán colonias que serán parcialmente Z^+ y parcialmente Z^-. Sin embargo, en una ruta replicativa, la transposición da como resultado células individuales que son por completo Z^+ o Z^-, y todas las colonias serán Z^+ o Z^-.

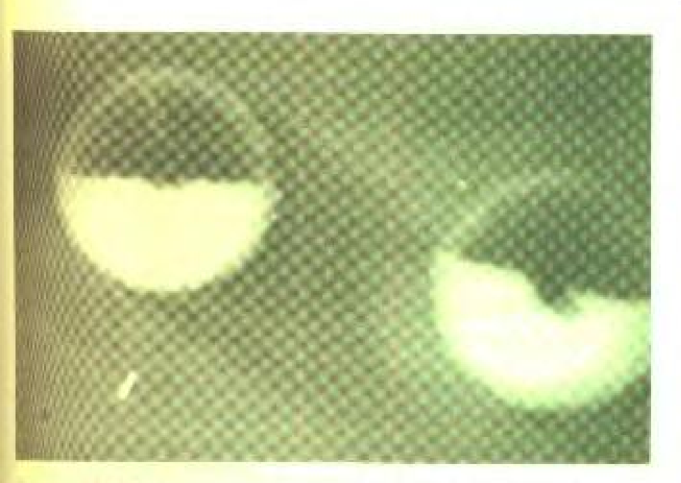


Figura 20-26. Colonias resultantes del experimento ilustrado en las Figuras 20-24 y 20-25. Se empleó un colorante para teñir las células Z^+ de azul. La mitad de estas colonias es Z^+ (área oscura) y la otra es Z^- (blanca). (Fotografía cortesía de N. Kleckner.)

van colonias con sectores (Fig. 20-26). Así, Tn10 —y quizá otros elementos transponibles de *E. coli* —se transponen escindiéndose del DNA donante e integrándose directamente en el DNA recipiente.

Consecuencias moleculares de la transposición

Las consecuencias moleculares de la transposición ofrecen una pista adicional sobre el mecanismo de transposición: tanto en la transposición conservativa como en la replicativa, los elementos transponibles generan la repetición de una secuencia del DNA diana. La Figura 20-27 representa la integración de IS1 en un gen. En el ejemplo mostrado, el hecho de integración da como resultado la repetición de 9 pb de la secuencia diana. El análisis de muchos hechos de integración revela que la secuencia repetida no resulta de una recombinación específica de sitio (como es el caso de la integración del fago λ; véase la página 229), sino que se genera durante el propio proceso de integración. El número de pares de bases repetidas es una característica de cada elemento. En las bacterias, las repeticiones más comunes son las de 9 pb y 5 pb.

Las observaciones precedentes han sido incorporadas en modelos de transposición bastante complejos. La mayoría de los modelos proponen que la enzima transposasa cifrada en el elemento produce cortes en escalón en el sitio diana y en los extremos del elemento transponible. A continuación, los extremos del elemento se ligan, por una de sus cadenas sencillas, a los extremos protuberantes del corte en escalón. Las etapas posteriores dependen del modo de transposición (replicativa o conservativa).

Reorganizaciones mediadas por los elementos transponibles

Los elementos transponibles dan lugar a una incidencia elevada de deleciones en su proximidad. Estas deleciones se extienden desde uno de los extremos del elemento hacia el DNA circundante (Fig. 20-28). Estos sucesos, así como las inversiones inducidas por los elementos, pueden considerarse como hechos de transposición aberrantes. Los transposones dan lugar también a deleciones fácilmente detectables, en las que parte del elemento se deleciona junto con DNA circundante de longitud variable. Este proceso de **escisión imprecisa** se reconoce en la actualidad

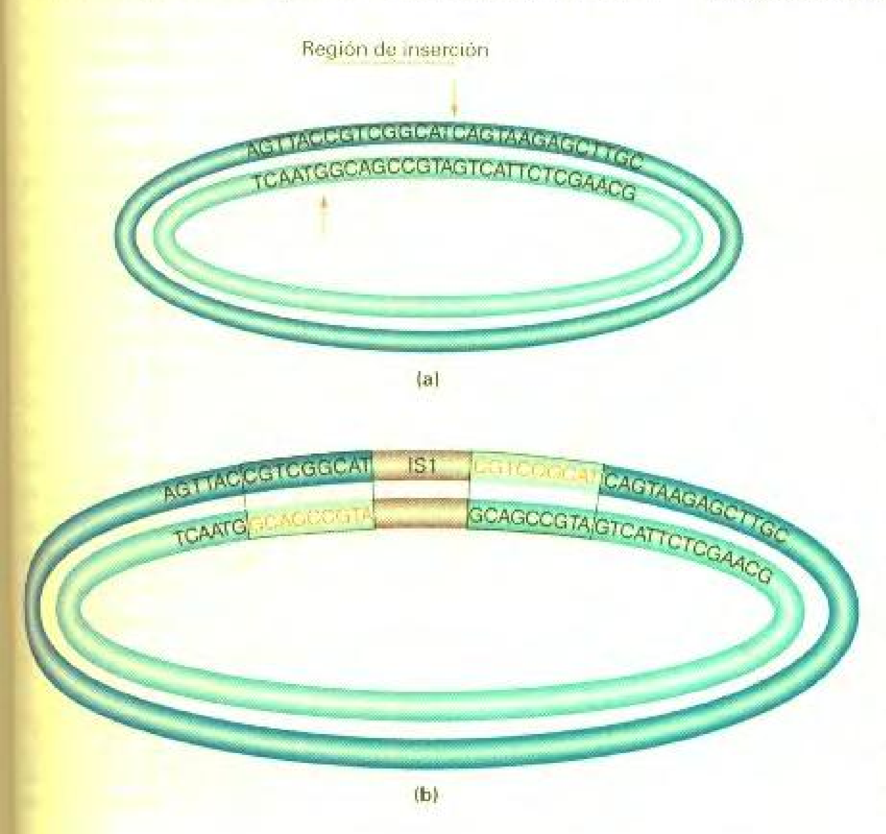


Figura 20-27. La inserción de un elemento transponible va asociada a la duplicación de una pequeña secuencia de nucleótidos en el DNA receptor; las dos copias flanquean al elemento insertado. En la figura, la duplicación que acompaña a la inserción está ilustrada de modo que se indica cómo puede haberse generado. La inserción de IS1 produce una duplicación de nueve nucleótidos. Si las dos cadenas del DNA receptor se cortan (flecha) en sitios escalonados que están separados nueve nucleótidos, como se muestra en a, seguido de la inserción de IS1 entre los extremos de cadena sencilla resultantes, entonces el posterior relleno de las cadenas sencillas a cada lado del elemento recién insertado con los nucleótidos complementarios correctos, indicados con letras rojas en b, podría explicar la aparición de las secuencias duplicadas. (Tomado de S. N. Cohen y J. A Shapiro, «Transposable Genetic Elements». Copyright © 1980 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

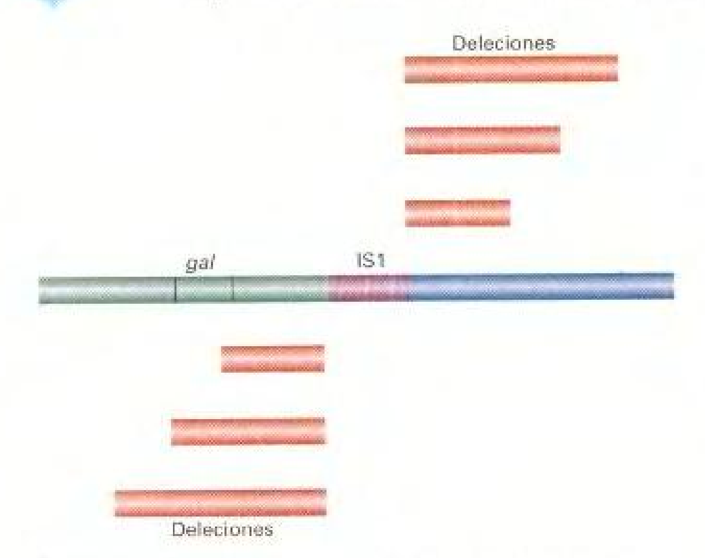


Figura 20-28. Formación de deleciones mediadas por un elemento transponible. En este ejemplo, el elemento transponible IS1 está situado en un punto del cromosoma de *E. coli* cercano a los genes *gal*. Las deleciones se generan a partir de cada extremo del elemento IS1, extendiéndose hacia las secuencias vecinas de DNA. Los casos en los que las deleciones se extienden hacia las regiones *gal* se pueden detectar por el fenotipo Gal resultante.

como una deleción o inversión que arranca de los extremos internos de los segmentos IR del transposón. El proceso de **escisión precisa** —la pérdida del elemento transponible y la restauración del gen que fue interrumpido por la inserción —ocurre también, aunque con frecuencias pequeñas si las comparamos con las de los hechos que acabamos de describir.

COROLARIO

Algunas secuencias de DNA de bacterias y fagos actúan como elementos genéticos transponibles. Estas secuencias son capaces de unir diferentes trozos de DNA y, de esta manera, insertar o escindir fragmentos de una molécula de DNA. Algunos elementos transponibles o móviles presentes en la naturaleza llevan genes de resistencia a antibióticos.

Resumen de los elementos transponibles de los procariotas

Revisemos lo que hemos aprendido hasta el momento sobre los elementos genéticos transponibles procarióticos:

1. Hay varios tipos distintos de elementos transponibles, que incluyen a las secuencias de inserción (IS1, IS2, . . .) y los transposones (Tn1, Tn2, . . .).
2. Dos copias de un elemento transponible pueden actuar de forma concertada para transponer el segmento de DNA que se encuentra entre ellas. Algunos de los transposones que confieren resistencia a antibióticos se formaron de esta forma, con dos secuencias de inserción que flanquean los genes para la resistencia al antibiótico.
3. La mayoría de los elementos transponibles contienen repeticiones invertidas (IR) reconocibles, algunas de las cuales se pueden observar al microscopio electrónico tras desnaturalización y renaturalización.
4. Los elementos transponibles se encuentran tanto en los cromosomas bacterianos como en los plásmidos.
5. Tras la inserción en un nuevo sitio del DNA, los elementos transponibles generan una secuencia repetida de pequeño tamaño, que consta normalmente de 9 ó 5 pb.
6. Aunque no se conoce con detalle el mecanismo de transposición, se han identificado dos rutas distintas. En algunos casos, la transposición tiene lugar mediante la replicación de una nueva copia del elemento en la diana. En otros casos, la transposición implica la escisión del elemento del sitio original y su reintegración en un sitio nuevo. Estos dos modelos de transposición se denominan *replicativo* y *conservativo*, respectivamente.

Se han encontrado elementos transponibles en los eucariotas, y algunos presentan estrechas similitudes con los observados en las bacterias, transponiéndose a través de intermediarios de DNA. Resulta interesante la transposición de otros elementos móviles a través de intermediarios de RNA que, en ciertos casos, recuerdan a los retrovirus de mamíferos.

Naturaleza molecular de los elementos transponibles de los eucariotas

Los elementos genéticos transponibles aparecen en los cromosomas eucarióticos incluso con mayor frecuencia que en los bacterianos. Por ejemplo, del 25 al 40 % de los cromosomas de los mamíferos constan de elementos transponibles que se han acumulado durante el transcurso de la evolución. Además, la mitad de las mutaciones espontáneas observadas en *Drosophila* se atribuyen al desplazamiento e inserción de elementos transponibles. El fenotipo conferido por la transposición se utilizó para la detección de los primeros elementos en el maíz, al igual que en las bacterias, por ejemplo, los granos de maíz con manchas y los mutantes Gal^- en las bacterias. En la actualidad, la mayoría de los elementos se detectan mediante el reconocimiento de sus secuencias características tras la secuenciación de grandes regiones cromosómicas. Algunos elementos eucarióticos, como los elementos *Ac* y *Ds* del maíz, y el elemento *P* de *Drosophila*, que se comentará más adelante, se transponen como DNA, al igual que hacen los elementos procarióticos. Sin embargo, la mayoría de los elementos eucarióticos emplean un mecanismo distinto, transponiéndose de igual forma a como lo hacen los virus de RNA. Puesto que muchos elementos transponibles parecen estar relacionados con los virus animales de RNA de cadena sencilla comenzaremos examinando algunos aspectos de estos virus.

Retrovirus

Los **retrovirus** son virus de animales con RNA de cadena sencilla que emplean un intermediario de DNA de doble cadena para

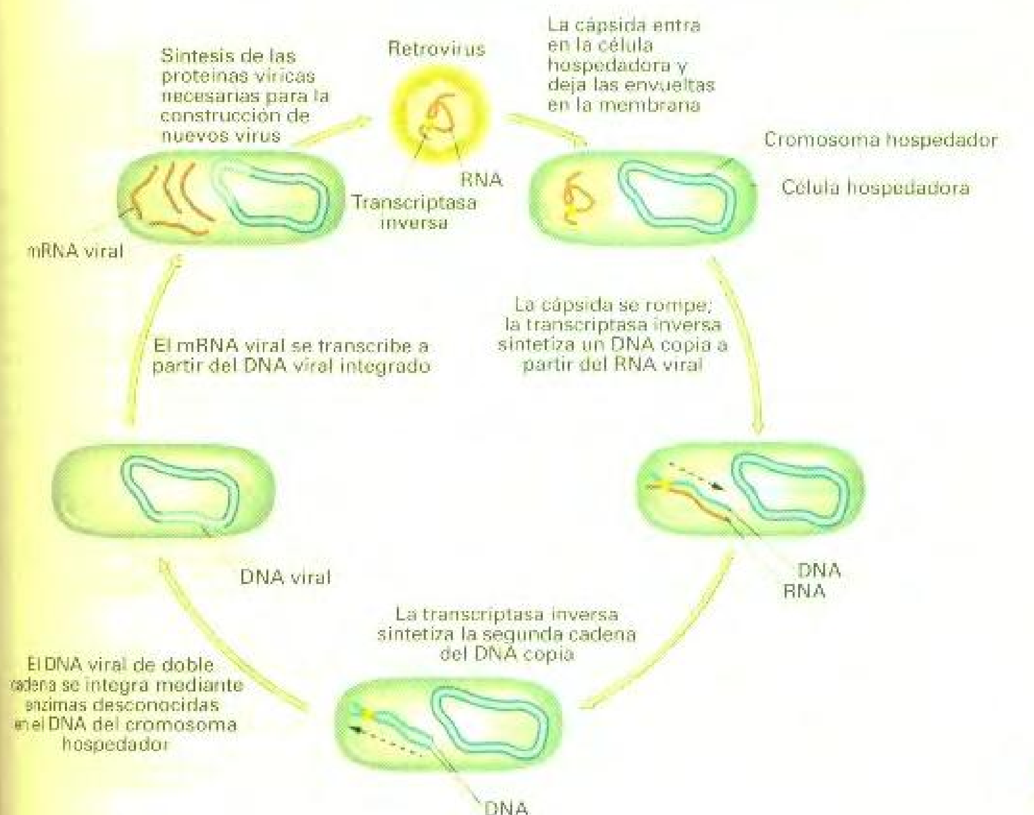


Figura 20-29. Ciclo de vida de un retrovirus. El RNA viral se muestra en rojo; el DNA, en azul.

su replicación. El RNA se copia en DNA mediante la acción de la enzima **transcriptasa inversa**. La Figura 20-29 muestra el ciclo de vida de un retrovirus típico. Algunos retrovirus, como el virus del tumor de mama de ratón (MMTV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV), son responsables de la inducción de tumores

Retrovirus

Polimerasa de RNA

Transcrito de RNA

Transcripciones inversas

DNA retroviral de doble cadena

Integración en un nuevo punto del DNA

Figura 20-30. Transposición de un retrovirus. Mediante la síntesis de un transcrito de RNA que se retrotranscribe en DNA de doble cadena, la transposición de los retrovirus genera de forma eficaz una inserción del nuevo DNA en un punto diferente del genoma.

cancerosos. Cuando se integran en los cromosomas hospedadores como DNA de doble cadena, estos retrovirus se denominan **provirus**. Los provirus, como el fago mu de las bacterias, pueden considerarse elementos transponibles, ya que pueden realmente transponerse de una posición a otra. La Figura 20-30 representa el mecanismo de transposición de un retrovirus.

Los retrovirus son similares estructuralmente a los elementos transponibles de otros organismos, como veremos a continuación. Además, la integración da lugar a la duplicación de una secuencia diana de pequeño tamaño en el cromosoma hospedador.

Retrotransposones

Los elementos transponibles que utilizan la transcriptasa inversa para transponerse mediante un intermediario de RNA se denominan **retrotransposones**. Estos elementos están muy extendidos entre los eucariotas, dividiéndose en dos clases. Los *retrotransposones virales* tienen propiedades similares a las de los retrovirus. Por ejemplo, presentan repeticiones terminales largas, o LTR, como se muestra en la Figura 20-31. Los elementos **Ty** de levadura y los elementos **copia** de *Drosophila* constituyen dos ejemplos de retrotransposones virales.

La Figura 20-32 muestra la estructura de uno de los elementos *Ty* de levadura: el *Ty1*, del que hay aproximadamente 35 copias en el genoma de levadura. Los extremos de 330 pb (secuencias terminales), denominados *secuencias δ (delta)*, están presentes en unas 100 copias por genoma. Las secuencias δ, así como los elementos *Ty*, muestran una divergencia de secuencia significativa. Los elementos *Ty* generan una repetición de la secuencia



Figura 20-31. Representación esquemática de un retrotransposón viral. Estos elementos contienen dos LTR (repeticiones terminales largas que flanquean una región central que cifra funciones proteicas específicas). (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed., p. 329. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)



Figura 20-32. Estructura de un elemento transponible de levadura. La secuencia *Ty1* aparece en un número aproximado de 35 copias en el genoma de la levadura. A cada extremo, dos copias de la secuencia delta (δ) en orientación directa. La secuencia delta se encuentra en un número aproximado de 100 copias en el genoma de la levadura.

diana (de 5 pb en este caso) durante la transposición, como ocurre con los transposones procarióticos; y causan mutaciones por inserción en genes diferentes del cromosoma de la levadura. En 1985, Jef Boeke y Gerald Fink utilizaron *Ty1* para demostrar que la transposición de los elementos *Ty* se produce a través de un intermediario de RNA.

La Figura 20-33 representa el diseño experimental empleado por Boeke, Fink y sus colegas para alterar un elemento *Ty*, clonado en un plásmido. En primer lugar, se insertó cerca del extremo de un elemento un promotor que podía activarse tras la adición de galactosa al medio. La utilización de un promotor sensible a la galactosa permite la manipulación de la expresión del RNA del *Ty*. La galactosa incrementa la transcripción del RNA del elemento. En segundo lugar, se introdujo un intrón de otro gen de levadura dentro de la región cifradora del transposón *Ty*.

La adición de galactosa da lugar a un gran incremento de la frecuencia de transposición del elemento *Ty* alterado. Este aumento sugiere la implicación del RNA, puesto que la transcripción estimulada por galactosa comienza en el promotor sensible a este azúcar (Fig. 20-33). El resultado clave del experimento, sin embargo, es el destino de la transposición del DNA del *Ty*. Cuando los investigadores examinaron el DNA del *Ty* resultante de las transposiciones, encontraron que el intrón había sido eliminado. Puesto que los intrones se escinden únicamente durante el procesamiento del RNA (véase el Cap. 10), el DNA del *Ty* movilizado debía haberse copiado de un intermediario de RNA transcrito a partir del elemento *Ty* original y procesarse a continuación mediante corte y empalme de dicho RNA. El DNA copia del mRNA sin el intrón se integra entonces en el cromosoma de levadura.

Los **elementos de tipo *copia*** de *Drosophila* comprenden al menos siete familias, que oscilan en tamaño desde 5 kb a 8.5 kb. Los miembros de cada familia aparecen en 10-100 posiciones del genoma de *Drosophila*. Cada miembro lleva una repetición

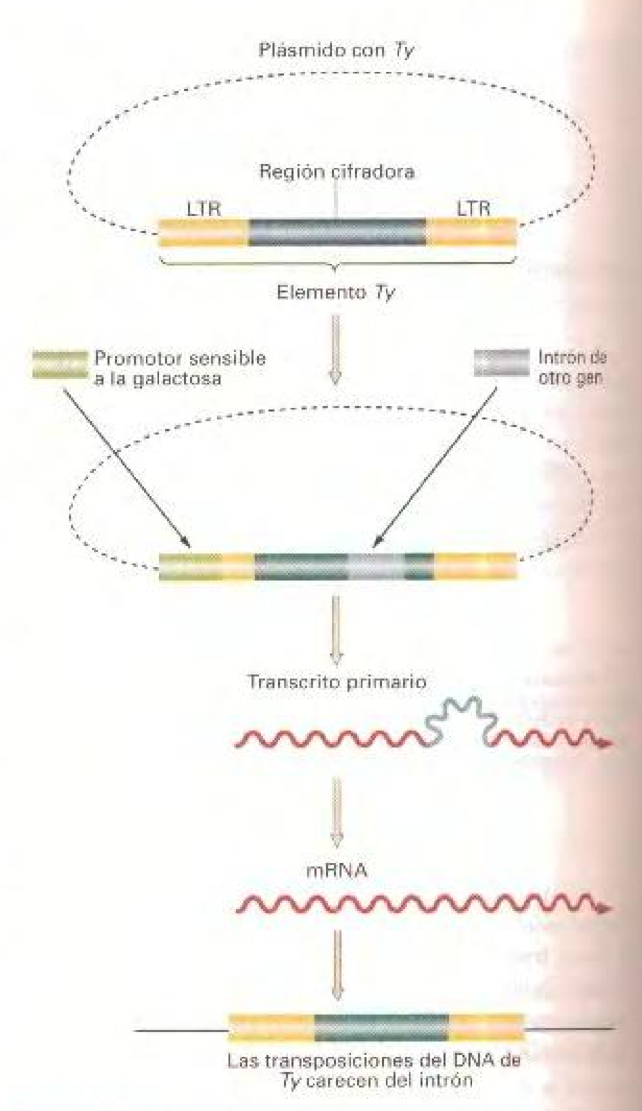


Figura 20-33. Demostración de la transposición a través de un intermediario de RNA. Se altera un elemento *Ty* mediante la colocación de un promotor que se activa con la adición de galactosa. La activación del promotor aumenta la transcripción del elemento *Ty*. Además, se inserta un intrón de otro gen dentro del elemento *Ty*. Puesto que el producto final de la transposición no contiene el intrón, éste debe haber sido eliminado del transcrito de RNA (véase el Cap. 10). Este procesamiento debe haber ocurrido como se muestra en la figura, en la que el transcrito primario contiene el intrón, pero no así el mRNA final procesado. Este mRNA es copiado entonces por la transcriptasa inversa e integrado en el DNA cromosómico. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed., pág. 329. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)

terminal directa larga y una repetición invertida imperfecta corta (Fig. 20-34), y es similar en estructura al elemento *Ty* de levadura. Los elementos de tipo *copia* producen también duplicaciones de un número característico de pares de bases en el DNA de *Drosophila* durante la inserción. Ciertas mutaciones clásicas de *Drosophila* se deben a la inserción de elementos de tipo *copia* y de otros elementos. Por ejemplo, la mutación *white-apricot* (w^a), que afecta al color de los ojos, se debe a la inserción de un elemento de la familia *copia* en el locus *white*.

La Figura 20-35 muestra las similitudes en las organizaciones entre los genes de retrovirus integrados en el DNA y los elemen-

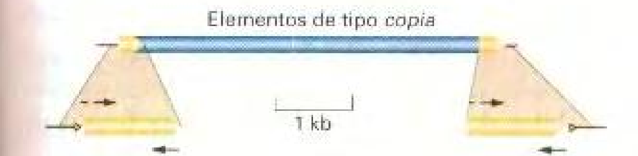


Figura 20-34. Los elementos de tipo *copia* presentan repeticiones terminales largas. Cada repetición representa alrededor del 5 % de la longitud del elemento. Las repeticiones se muestran a una escala expandida debajo del elemento para ilustrar la presencia de repeticiones invertidas imperfectas cortas (→) en los extremos de cada repetición directa larga y la de unos pocos pares de bases de secuencia diana duplicada (▷) que flanquean al elemento tras la inserción. Las distintas copias genómicas de los elementos de la familia son muy parecidos en estructura. (Tomado de G. Robins, en J. A. Shapiro, ed. *Mobile Genetic Elements*, págs. 329-361. Copyright 1983 de Academic Press.)

Genes de DNA del retrovirus y de los retrotransposones virales
DNA retroviral
gag pol int env
Ty912 (levadura)
gag int ?env pol
copia (*Drosophila*)
gag int ?env pol
LTR específica del elemento

Figura 20-35. Comparación de los genes del DNA integrado de un retrovirus y los elementos *Ty* de levadura y *copia* de *Drosophila*. Las cuatro proteínas determinadas por el DNA del retrovirus tienen sus equivalentes en los elementos de levadura y *Drosophila* mostrados en la figura. Las LTR se representan con los extremos coloreados de los elementos. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed., pág. 329. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)

los *Ty* y *copia*. Observe cómo cada una de las proteínas cifradas en el retrovirus tiene su equivalente en los transposones *Ty* y *copia*.

Retrotransposones no virales: LINE y SINE

Los **retrotransposones no virales** son los que se encuentran con mayor frecuencia en los mamíferos. Los LINE (elementos intercalados largos) y los SINE (elementos intercalados cortos, que incluyen a las secuencias *Alu*), comentados en el Capítulo 3, son los más abundantes. Todos estos elementos están repetidos muchas veces en los genomas de los mamíferos. El genoma humano tiene de 20 000 a 40 000 LINE y alrededor de 500 000 SINE, la mayoría de los cuales presenta alguna divergencia de secuencia. La Figura 20-36, que muestra la distribución de los elementos repetidos en el gen de la dioxigenasa del ácido homogentísico [el gen cuya disfunción causa la alcaptonuria (*AKU* o *HGO*)], puede dar una idea de la abundancia de los elementos repetidos en el genoma humano.

Función de los elementos transponibles

Los elementos transponibles desempeñan una función en la biología de los organismos. Causan mutaciones por su inserción en los genes y afectan a la regulación de éstos cuando se insertan cerca de los promotores. Así mismo, proporcionan sustratos para las reorganizaciones genéticas y, de esta manera, actúan como agentes de la evolución de los genomas. Por ejemplo, en células de *E. coli* dividiéndose en medios naturales, una fracción considerable de las mutaciones espontáneas se debe a distintos tipos de IS. Como se mencionó con anterioridad, más de la mitad de las mutaciones espontáneas que se producen en *Drosophila* resultan de la inserción de elementos transponibles. La inserción de elementos IS cerca de la región promotora del operón *bgl*, que cifra proteínas que participan en el metabolismo del β-glucósido, activa la expresión de este operón normalmente «críptico». Hay otros numerosos ejemplos de inserciones que activan la expresión génica.

Los elementos de inserción proporcionan regiones movibles de homocigosis que sirven de sustratos a las enzimas implicadas en la recombinación, dando lugar a deleciones, duplicaciones e inversiones. Hay evidencias de que las reorganizaciones mediadas por los elementos transponibles pueden haber desempeñado una función importante en la formación de los genomas de diferentes organismos, así como de que han contribuido a la aparición de nuevas funciones mediante la estimulación de duplicaciones de genes. Los elementos transponibles se han acumulado durante la evolución hasta el punto de constituir una fracción importante del genoma de las células superiores. Por ejemplo, en la especie humana, aproximadamente el 30 % del DNA genómico está constituido por elementos transponibles. La evolución de los diferentes microorganismos resistentes a antibióticos está influida por los elementos transponibles. Recuerde los transposones, que pueden generar distintas combinaciones de genes que determinan resistencias en los plásmidos R, los cuales se transfieren a otras bacterias.

Usos de los elementos transponibles

Los elementos transponibles tienen muchos usos. En los procariotas, el gen de resistencia a antibiótico que llevan diferentes transposones tiene utilidad como marcador genético. Por ejemplo, transposones derivados de Tn10 se utilizan a menudo para generar inserciones en el cromosoma bacteriano. Después de la selección de las células resistentes a la tetraciclina (Tet^r), cada una de las cuales contiene una inserción en algún lugar del cromosoma, se puede cartografiar genéticamente la posición del inserto, mediante la detección del fenotipo Tet^r, o físicamente, empleando cebadores complementarios a los extremos de Tn10 para obtener el DNA bacteriano adyacente al transposón y contrastando esta secuencia con la ya conocida del genoma completo (en *S. typhimurium* y *E. coli*, por ejemplo). Mediante la utilización de transposones ligados, los genes pueden transferirse fácilmente de una estirpe a otra y clonarse mediante la selección del marcador de resistencia, que se habrá insertado dentro o muy cerca del gen de interés. En los eucariotas, los elementos transponibles se utilizan también para generar mutaciones por inserción, cartografiarlas y facilitar tanto la clonación de los genes como la obtención de organismos transgénicos.

Elementos *P*

El elemento *P* de *Drosophila* representa uno de los mejores ejemplos de explotación de las propiedades de los elementos

Figura 20-36. Elementos repetidos encontrados en el gen humano (*HGO*) que cifra la dioxigenesa del ácido homogentísico, la enzima cuya falta causa la alcaptonuria. La primera línea ilustra la posición de los exones en *HGO*. En color, se indica la situación y orientación de las secuencias *Alu* (azul), SINE (morado), LINE (amarillo), secuencias derivadas de los retrotransposones (LTR, en rojo) y repeticiones de secuencias cortas (SSR, en granate) dentro del gen *HGO*. (Adaptado de B. Granadino, D. Beltrán-Valero de Bernabé, J. M. Fernández-Cañón, M. A. Peñalva y S. Rodríguez de Córdoba, «The Human Homogentisate 1,2-Dyoxigenase (*HGO*) Gene». *Genomics* 43, 1997, 115.)

transponibles en los eucariotas. Este elemento, mostrado en la Figura 20-37, tiene una longitud de 2907 pb y presenta una repetición invertida de 31 pb en cada extremo. El elemento cifra una transposasa que, aunque se requiere para la transposición, puede ser aportada por un segundo elemento. Por lo tanto, los elementos *P* con deleciones internas pueden movilizarse y permanecer entonces fijos en la posición nueva en ausencia del segundo elemento, sirviendo así como un marcador útil. Los elementos *P* no emplean un intermediario de RNA durante la transposición y se pueden insertar en muchos lugares distintos de los cromosomas de *Drosophila*. La transposición de un elemento *P* está controlada por represores determinados por el elemento.

Los elementos *P* se han desarrollado como herramientas para *Drosophila*, al igual que se ha hecho con transposones como el Tn10 en las bacterias. A saber, los elementos *P* se pueden emplear para generar mutaciones por inserción, marcar la posición de los genes y facilitar la clonación de éstos. Se pueden insertar *in vivo* en los genes y seleccionarse los diferentes fenotipos a partir de esa situación, pueden clonarse los genes que hayan sido interrumpidos, utilizando sondas de segmentos del elemento *P*. Este método ha recibido la denominación de *etiquetado o señalización con transposón* (*transposon tagging*). Se pueden utilizar

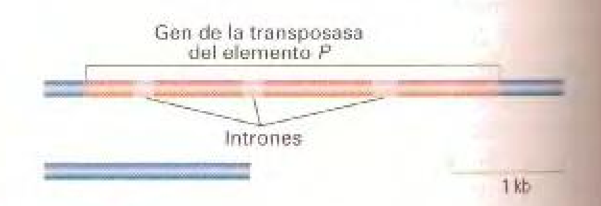


Figura 20-37. Estructura del elemento *P*. El análisis de la secuencia de DNA de las 2,9 kb del elemento revela la existencia de un gen, compuesto por cuatro exones y tres intrones, que determina la transposasa. Se observa una repetición invertida perfecta de 31 pb a cada extremo. (Tomado de G. Robin, en J. A. Shapiro, ed., *Mobile Genetic Elements*, págs. 329-361. Copyright 1983 de Academic Press.)

cebadores complementarios a la secuencia de 31 pb para secuenciar las regiones adyacentes a los sitios de inserción del elemento *P*.

Utilización de los elementos *P* para insertar genes

Gerald Rubin y Allan Spradling demostraron que el DNA del elemento *P* puede emplearse como un vehículo eficaz para la transferencia de genes donantes a la línea germinal de una mosca receptora. Rubin y Spradling idearon el siguiente procedimiento experimental (Fig. 20-38). El genotipo receptor es homocigótico para la mutación *rosy* (ry^-), que confiere un color de ojo característico. Se recogen embriones de esta estirpe que hayan completado nueve divisiones nucleares. En este estadio, el embrión es una célula multinucleada y los núcleos destinados a formar la línea germinal se agrupan en uno de los extremos. (Los elementos *P* se movilizan únicamente en las células de la línea germinal). Se inyectan dos tipos de DNA en los embriones recogidos. El primero es un plásmido bacteriano que lleva un elemento *P* delecionado en el que se ha introducido un alelo ry^+. Este elemento delecionado es incapaz de transponerse, debido a la deleción; así que también se inyecta un plásmido auxiliar que contiene un elemento completo. Fenotípicamente, las moscas que se desarrollan de estos embriones son todavía mutantes rosy, pero en la descendencia se observa una gran proporción de moscas ry^+. Los descendientes ry^+ muestran herencia mendeliana para el alelo ry^+ recién adquirido, lo que sugiere que éste se localiza en un cromosoma. Esta posición se confirmó mediante hibridación *in situ*, demostrándose que el alelo ry^+, junto con el elemento *P* delecionado, se había insertado en una posición concreta del genoma. Ninguna de las inserciones generadas se había producido exactamente en el locus normal del gen *rosy*. Se ha comprobado que estos nuevos alelos ry^+ se heredan de manera estable. Una variación de este método, descrito en el Capítulo 13, emplea los elementos *P* para generar moscas *Drosophila* transgénicas mediante la transferencia de los genes foráneos a la línea germinal y la observación de sus patrones de expresión.

Resumen de los elementos transponibles de los eucariotas

Examinemos algunos de los puntos esenciales de los elementos transponibles eucarióticos:

1. Existen elementos transponibles en todas las células. Los elementos de levadura, *Drosophila* y maíz han sido particularmente bien estudiados, como lo han sido también los retrovirus en las células de los mamíferos.
2. Algunos elementos transponibles se han utilizado como herramientas para la clonación y la manipulación de genes. Por ejemplo, los elementos *P* de *Drosophila* se pueden emplear para transferir genes a la línea germinal de una mosca receptora. Otro ejemplo, el segmento T-DNA de los plásmidos Ti (descritos en el Cap. 13) se puede utilizar para introducir genes clonados en ciertas plantas.
3. Una similitud entre los elementos transponibles eucarióticos y sus equivalentes en los procariotas es que la translocación a un nuevo sitio origina una repetición de pequeño tamaño en la secuencia diana.
4. Una diferencia entre ciertos elementos transponibles eucarióticos y los procarióticos reside en el mecanismo de transposición. Algunos elementos transponibles eucarióticos se transponen mediante un intermediario de RNA; los elementos procarióticos no emplean un intermediario de RNA.

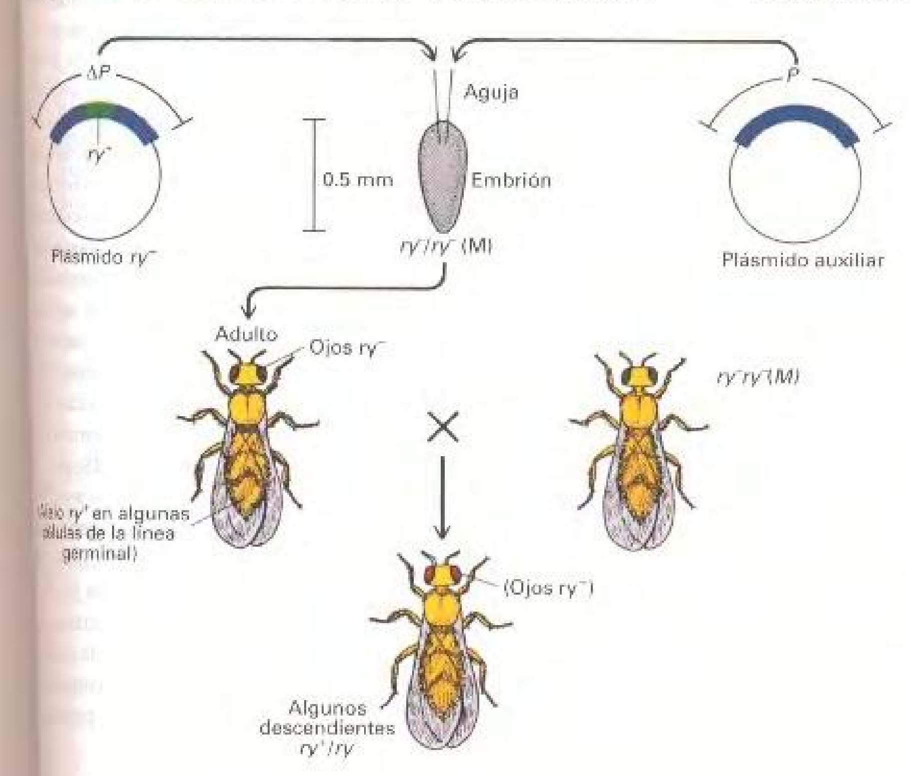


Figura 20-38. Transferencia génica en *Drosophila* mediada por el elemento Δ*P*. El alelo silvestre del gen para el color de ojos *rosy* (ry^+) está insertado en un elemento *P* delecionado (Δ*P*) presente en un plásmido bacteriano. Al mismo tiempo, se utiliza un plásmido auxiliar que lleva un elemento *P* intacto. Se inyectan ambos en un embrión ry^-, donde el alelo ry^+ se transpone junto con el elemento Δ*P* al genoma de las células de la línea germinal.

RESUMEN

La naturaleza ha diseñado muchas formas de cambiar la arquitectura genética de los organismos. Ahora estamos empezando a comprender los procesos moleculares que hay tras estos fenómenos. La mutación génica, la recombinación de los cromosomas y la transposición pueden explicarse razonablemente bien en cuanto a su efecto en el DNA. Lejos de producir sólo desecho genético, no queda duda alguna de que todos estos procesos desempeñan papeles importantes en la evolución. Esta idea se ve reforzada por el conocimiento de que los propios procesos están, en gran medida, bajo control genético: hay genes que afectan a la eficacia de mutación, de recombinación y de transposición.

Aunque algunas veces se utilizan mecanismos de transposición distintos, las analogías entre los elementos transponibles de fagos, bacterias y eucariotas resultan sorprendentes. Por el momento, no se sabe si los transposones son elementos que desempeñan normalmente una función en las operaciones rutinarias de los genomas, como propuso inicialmente Barbara McClintock en los años cincuenta, o si son trozos de «DNA egoísta» cuya existencia no tiene otro propósito que el de su propia supervivencia. Cualquiera que sea la realidad de este asunto, los transposones constituyen ciertamente un elemento de caos completamente inesperado en el genoma, que los genetistas ya han explotado en sus procedimientos analíticos. Respecto a la evolución, los transposones pueden ser importantes en los cambios súbitos que caracterizan al registro fósil.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

elemento IS / plásmidos / transposones / repeticiones invertidas / reorganizaciones / fenotipo / etiquetado / mutaciones inestables / sectores

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

En el Capítulo 11 estudiamos el modelo del operón. Observe que el orden de transcipción de los genes del operón *gal* es *E-T-K*. Suponga que tenemos cinco mutaciones distintas en *galT*: *gal-1*, *gal-2*, *gal-3*, *gal-4* y *gal-5*. La tabla siguiente muestra la expresión de *galE* y *galK* en los mutantes que llevan estas mutaciones:

Mutación *galT*	Expresión de *galE*	Expresión de *galK*
gal-1	+	–
gal-2	+	–
gal-3	+	–
gal-4	+	+
gal-5	+	+

Además, la tabla siguiente muestra los patrones de reversión de estas mutaciones con varios de los mutágenos que estudiamos en el Capítulo 19. El signo «+» indica una tasa de reversión elevada en presencia de un mutágeno, el símbolo «–» representa ausencia de reversión y «baja» indica una tasa de reversión baja.

	REVERSIÓN				
Mutación	Espontánea	2-aminopurina	ICR191	UV	EMS
gal-1	–	–	+	+	–
gal-3	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja
gal-4	–	–	–	–	–
gal-5	Baja	+	Baja	+	+

¿Cuál de estas mutaciones es más probable que se deba a la inserción de un elemento transponible como el IS1 y por qué? ¿Puede asignar las otras mutaciones a otras categorías?

♦ Solución ♦

Los elementos transponibles tienen un efecto polar, impidiendo la expresión de los genes situados aguas abajo del sitio de inserción, pero no la de los genes situados aguas arriba. Por lo tanto, cabe esperar que la mutación por inserción impida la expresión del gen *galK*. Tres mutaciones son de esta clase: *gal-1*, *gal-2* y *gal-3*. Éstas podrían ser cambios de fase, mutaciones sin sentido o inserciones, ya que cualquiera de ellas podría tener efecto polar. Sin embargo, si examinamos los datos de reversión podemos distinguir entre estas posibilidades. Los elementos transponibles revierten espontáneamente con tasas bajas que no se estimulan con análogos de bases, mutágenos de cambio de fase, agentes alquilantes o UV. De acuerdo con estos criterios, la mutación *gal-3* es la que con mayor probabilidad se debe a una inserción ya que revierte con una tasa baja que no se incrementa con ninguno de los mutágenos. La mutación *gal-1* podría ser un cambio de fase, puesto que no revierte ni con 2-AP ni con EMS, pero sí lo hace con ICR191, un mutágeno de cambio de fase, y con UV. (Remítase al Cap. 16 para los detalles de cada mutágeno). De igual manera, la mutación *gal-2* es probablemente un cambio de fase, puesto que revierte sólo con ICR191. La mutación *gal-4* es probablemente una deleción, ya que no es posible estimular su reversión en absoluto. La mutación *gal-5* parece ser una sustitución de base, puesto que revierte con 2-AP, pero el compuesto ICR191 no consigue incrementar su tasa de reversión espontánea

Problemas Resueltos

Los elementos transponibles han sido llamados «genes saltadores», puesto que parecen saltar de una posición a otra, dejando el locus original y apareciendo en uno nuevo. A la luz de lo que sabemos sobre el mecanismo de transposición, ¿en qué medida resulta apropiado el término «genes saltadores» para los elementos transponibles bacterianos?

♦ Solución ♦

En las bacterias, la transposición tiene lugar de dos formas distintas. La forma conservativa da lugar a verdaderos genes saltadores, puesto que en este caso el elemento transponible se escinde de su posición original y se inserta en una nueva. Una segunda forma se denomina *replicativa*. En esta ruta, los elementos transponibles se mueven a nuevas posiciones replicándose en el DNA diana y dejando una copia del elemento transponible en el sitio original. Cuando opera la forma replicativa, los elementos transponibles no son realmente genes saltadores, puesto que permanece una copia en el sitio original.

Problemas

1. Suponga que desea determinar si una nueva mutación en la región *gal* de *E. coli* es el resultado de una inserción de DNA. Describa dos experimentos que le permitan demostrar físicamente la presencia de una inserción.

2. Explique la diferencia entre las formas de transposición replicativa y conservativa. Describa brevemente un experimento que demuestre cada una de estas formas en los procariotas.

3. Describa el origen de los plásmidos que confieren resistencia a múltiples drogas.

4. Describa brevemente el experimento que demuestra que la transposición del elemento *Ty* de levaduras tiene lugar mediante un intermediario de RNA.

5. Explique cómo las propiedades de los elementos *P* de *Drosophila* hacen posibles los experimentos de transferencia de genes en este organismo.

6. Cuando Rhoades tomó polen de anteras completamente pigmentadas de plantas de genotipo a_1/a_1 ; Dt/Dt y lo empleó para polinizar plantas femeninas a_1/a_1 ; dt/dt, encontró granos completamente pigmentados y, además, algunos granos moteados. Explique el origen de *ambos* fenotipos.

7. En *Drosophila*, M. Green descubrió un alelo *singed* (*sn*) con algunas características inusuales. Las hembras homocigóticas para este alelo ligado al X tienen las cerdas chamuscadas, aunque presentan numerosos parches de cerdas sn^+ (silvestre) en la cabeza, tórax y abdomen. Cuando se cruzan éstas moscas con machos *sn*, algunas hembras dan únicamente descendencia con cerdas chamuscadas, pero otras producen descendencia tanto de cerdas chamuscadas como silvestres en proporciones variables. Explique estos resultados.

8. Los tumores en agalla de la corona aparecen en muchas plantas dicotiledóneas infectadas por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Los tumores se deben a la inserción en el genoma de la planta de DNA de un gran plásmido que lleva la bacteria. Suponga que una planta de tabaco de tipo A (hay muchos tipos de plantas de tabaco) es infectada y desarrolla tumores. Usted recoge tejido del tumor y lo cultiva en medio sintético. Algunos de estos cultivos de los tumores producen tallos aéreos. Injerta uno de estos tallos en una planta de tabaco normal de tipo B, y el injerto crece hasta desarrollar un tallo y flores de tipo A, aparentemente normales.

   a. Recoge células del injerto y las coloca en medio sintético, donde crecen como células tumorales. Explique por qué el injerto parece normal.

   b. Cuando el injerto produce semillas, la descendencia resultante está formada por plantas normales de tipo A. No queda rastro del DNA insertado del plásmido. Proponga alguna explicación para este «cambio».

9. Considere dos plantas de maíz:

   a. Genotipo C/c^m ; Ac/Ac^+, donde c^m es un alelo inestable causado por la inserción de *Ds*.

   b. Genotipo C/c^m, donde c^m es un alelo inestable producido por la inserción de *Ac*.

   ¿Qué fenotipos y en qué proporciones producirán cuando: (1) cada planta se cruza con un mutante *c/c* por cambio de base, y (2) la planta del apartado a se cruza con la del apartado b? Suponga que *Ac* y *c* no están ligados, que la frecuencia de rotura cromosómica es despreciable y que el mutante *c/c* es Ac^+.

Con mucho, la mayor parte del DNA de los organismos eucarióticos se encuentra en los cromosomas nucleares. Sin embargo, dos clases de orgánulos, las mitocondrias y los cloroplastos (Fig. 21-1), contienen un solo tipo de «cromosoma» con genes que determinan funciones específicas del orgánulo. El cromosoma mitocondrial se denomina **mtDNA** y el cloroplástico **cpDNA**. La función de los genes mitocondriales está dirigida a la síntesis de ATP («energía química») mediante la fosforilación oxidativa, que tiene lugar en la propia mitocondria. Los genes del cloroplasto están fundamentalmente implicados en la síntesis de ATP mediante la fotosíntesis.

El número de genes en los cromosomas de los orgánulos es pequeño, cuando lo comparamos con el del núcleo. Por ejemplo, el genoma nuclear humano consta de 3 000 000 kb de DNA que contiene alrededor de 100 000 genes, mientras que el mtDNA humano tiene únicamente 17 kb con tan sólo 37 genes. En cualquier organismo, un gen situado en el cromosoma de un orgánulo no suele aparecer también en los cromosomas nucleares, aunque unos pocos pueden estar presentes en el núcleo como pseudogenes inactivos. En estructura y función, los genes de los orgánulos muestran muchas similitudes con los genes nucleares; no obstante, existen suficientes diferencias en su acción y herencia como para ser dignos de un tratamiento especial en un capítulo propio.

COROLARIO

Las mitocondrias y los cloroplastos presentan un único tipo de cromosoma, relativamente pequeño, que contiene algunos de los genes necesarios para la función del orgánulo.

Origen de los genes extranucleares

La cuestión de cómo las mitocondrias y los cloroplastos adquirieron estas dotaciones específicas de genes es aún materia de investigación y debate en Biología. Parte de la respuesta se encuentra en el origen de los propios cloroplastos y mitocondrias. En general, se asume que estos dos orgánulos aparecieron a lo largo de la evolución como endosimbiontes. En concreto, las células de los ancestros de los eucariotas fueron «invadidas» en momentos diferentes por células procarióticas, una de las cuales era fotosintética y dio lugar a los cloroplastos, y la otra que no lo era dio lugar a las mitocondrias. Estas invasiones permitieron el establecimiento de simbiosis beneficiosas para todos los tipos celulares implicados, y constituyeron un hecho clave en el origen de las líneas que finalmente se convertirían en los eucariotas modernos.

Sin embargo, los procariotas invasores ancestrales debían contener muchos más genes que los presentes en las mitocondrias y los cloroplastos modernos. Los indicios sugieren que algunos de estos genes se perdieron, mientras que otros se incorporaron al núcleo. El conjunto preciso de los genes que permanecen en los orgánulos de los eucariotas modernos es algo variable, aunque ciertos genes tienden a aparecer en todos los organismos. Es probable que exista una ventaja adaptativa en el hecho de que algunos genes estén situados en el propio orgánulo. Posiblemente, las diferencias entre los organismos se deban a diferencias en los patrones de migración de los genes de los orgánulos durante la evolución de los distintos eucariotas. Se desconocen las razones precisas de estas diferencias.

La mayoría de las células eucarióticas modernas dependen completamente de los genes de los orgánulos para realizar su función normal; por lo tanto, lo que originalmente surgió como una simbiosis opcional resulta ahora algo obligatorio. No obstante, se sabe que algunos organismos pueden sobrevivir sin sus mitocondrias o sus cloroplastos. Por ejemplo, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede obtener energía de la fermentación, un tipo de química que no requiere los genes mitocondriales. En consecuencia, los mutantes que carecen de estos genes pueden sobrevivir. En otro ejemplo, algunas plantas pueden vivir saprofíticamente sin los genes de sus cloroplastos.

Estructura de los cromosomas de los orgánulos

Las mitocondrias y los cloroplastos se pueden aislar mediante varios métodos de fraccionamiento celular, y el DNA de los orgánulos se puede obtener de estas fracciones empleando un procedimiento usual de extracción. La utilización de la tecnología estándar del DNA recombinante (Caps. 12 y 13) ha permitido la obtención de la secuencia completa de los cromosomas de los orgánulos. Las funciones de los genes localizados en ellos se han determinado mediante una combinación del análisis por mutación (véase el siguiente apartado) y por la homología con secuencias de función conocida depositadas en las bases de datos de DNA.

Organización general

En este punto observamos la primera gran diferencia entre los cromosomas de los orgánulos y los nucleares. La mayoría de los cromosomas de los orgánulos son fundamentalmente circulares. La evidencia de esta circularidad está en que los mapas de restricción de estos DNA son circulares y, además, se pueden ver círculos de DNA en las preparaciones de orgánulos observados al microscopio electrónico. Hay evidencias de que algunos cromosomas de orgánulos adoptan formas lineales, aunque la mayoría de los genetistas los trata generalmente como si fueran círculos.

Otra diferencia importante en la organización general estriba en que los cromosomas de los orgánulos no están en la forma muy condensada en la que aparecen los cromosomas eucarióticos; es decir, no están en estado de eucromatina.

¿Cuántas copias?

En este subapartado vemos otra diferencia: mientras que los cromosomas nucleares están presentes en una copia por célula (haploide) o en dos copias (diploide), los cromosomas de los orgánulos aparecen en muchas copias por célula, a menudo cientos o miles. La regulación del número de copias en la célula es relativamente relajada; de forma que en distintas células del mismo organismo hay algo de variación alrededor del valor medio.

21

GENES EXTRANUCLEARES



Mosaico variegado en *Euonymus fortunei*. Este mosaico se debe a la segregación durante la división celular de una mezcla de dos tipos de cloroplastos con DNA diferentes, uno normal y otro que da lugar a tejido albino. La segregación produce hojas variegadas o, con menor frecuencia, ramas completas verdes o albinas. *(Anthony Griffiths.)*

Ideas fundamentales

Los cloroplastos y las mitocondrias contienen muchas copias de un único «cromosoma» portador de genes.

En los cruzamientos, el DNA de los orgánulos —y cualquier carácter fenotípico que determine —se hereda normalmente a través del parental materno.

Cuando hay una mezcla de dos DNA mitocondriales o cloroplásticos genéticamente distintos, se suele observar un proceso de partición que origina células descendientes de un tipo o de otro.

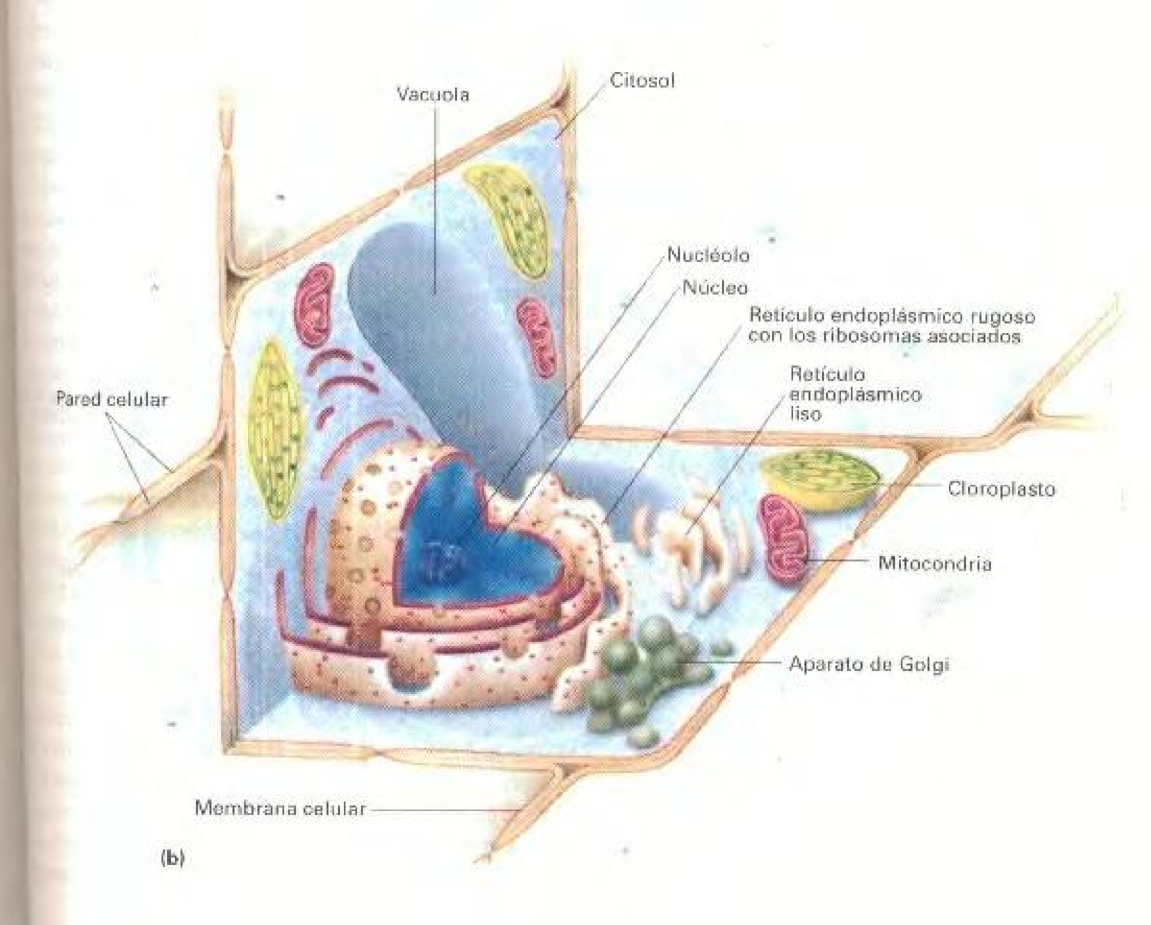
En mezclas de orgánulos «dihíbridos», se pueden detectar fenómenos de recombinación.

Los genes de los orgánulos cifran fundamentalmente componentes de la maquinaria de traducción del orgánulo y de los sistemas de producción de energía.

La mayoría de los polipéptidos cifrados en los orgánulos se ensamblan con polipéptidos determinados por los genes nucleares para producir las proteínas activas, con función en el orgánulo.

Figura 21-1. Estructuras de (a) una célula animal típica y (b) una célula vegetal típica.

Microvellosidades
Membrana celular
Mitocondria
Núcleo
Retículo endoplásmico rugoso con los ribosomas asociados
Nucléolo
Retículo endoplásmico liso
Cromosomas
Membrana nuclear
Aparato de Golgi
Lisosoma
Citosol
Centríolos
Poro nuclear
(a)



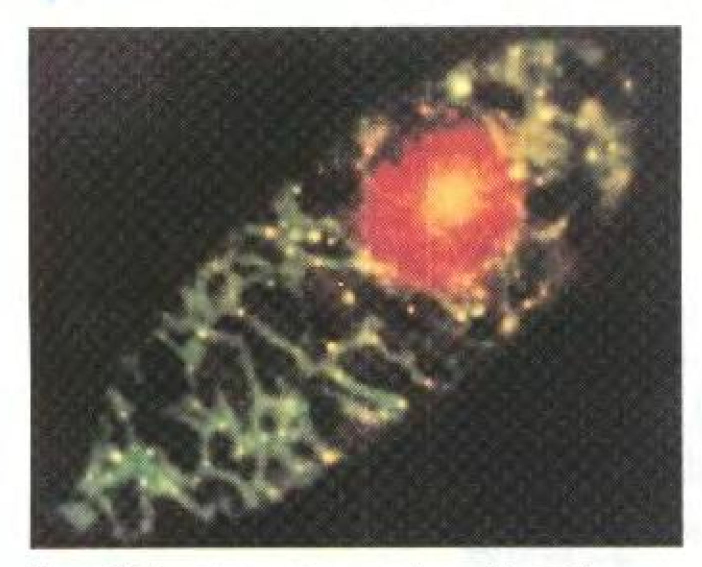


Figura 21-2. Tinción con fluorescencia de una célula de *Euglena gracilis*. Con los colorantes empleados, el núcleo aparece teñido de color rojo debido a la fluorescencia de la gran cantidad de DNA nuclear. Las mitocondrias presentan fluorescencia verde, y dentro de éstas los mtDNA (los nucleoides) dan color amarillo. (Tomado de Y. Huyashi y K. Veda, *Journal of Cell Science* 93, 1989, 565.)

Las células de las hojas de la remolacha de jardín tienen unos 40 cloroplastos por célula. Los propios cloroplastos presentan áreas concretas que se tiñen densamente con colorantes para el DNA; estas áreas se denominan **nucleoides** y constituyen una característica común de muchos orgánulos. Cada cloroplasto de la remolacha de jardín contiene de 4 a 8 nucleoides y cada uno de ellos puede tener de 4 a 18 moléculas de cpDNA (DNA del cloroplasto). Por lo tanto, una única célula de una hoja de remolacha de jardín pueden tener unas $40 \times 8 \times 18 = 5760$ copias del genoma del cloroplasto. Aunque el protista fotosintético *Chlamydomonas* tiene un solo cloroplasto por célula, éste contiene de 500 a 1500 moléculas de cpDNA, normalmente empaquetadas en nucleoides.

¿Qué podemos decir de las mitocondrias? Una célula haploide «típica» de levadura puede tener de 1 a 45 mitocondrias, cada una de ellas con 10 a 30 nucleoides, y con 4 ó 5 moléculas en cada nucleoide. La Figura 21-2 muestra los nucleoides mitocondriales del organismo unicelular *Euglena gracilis*. En las células humanas, puede haber de 2 a 10 moléculas de mtDNA (DNA mitocondrial) por mitocondria. El número de mitocondrias por célula difiere en los distintos tipos celulares. Por lo tanto, varía tanto el número de cromosomas por mitocondria como el número de las mismas. Hay varios cientos de moléculas de mtDNA en los fibroblastos humanos y aproximadamente 100 000 en los oocitos humanos.

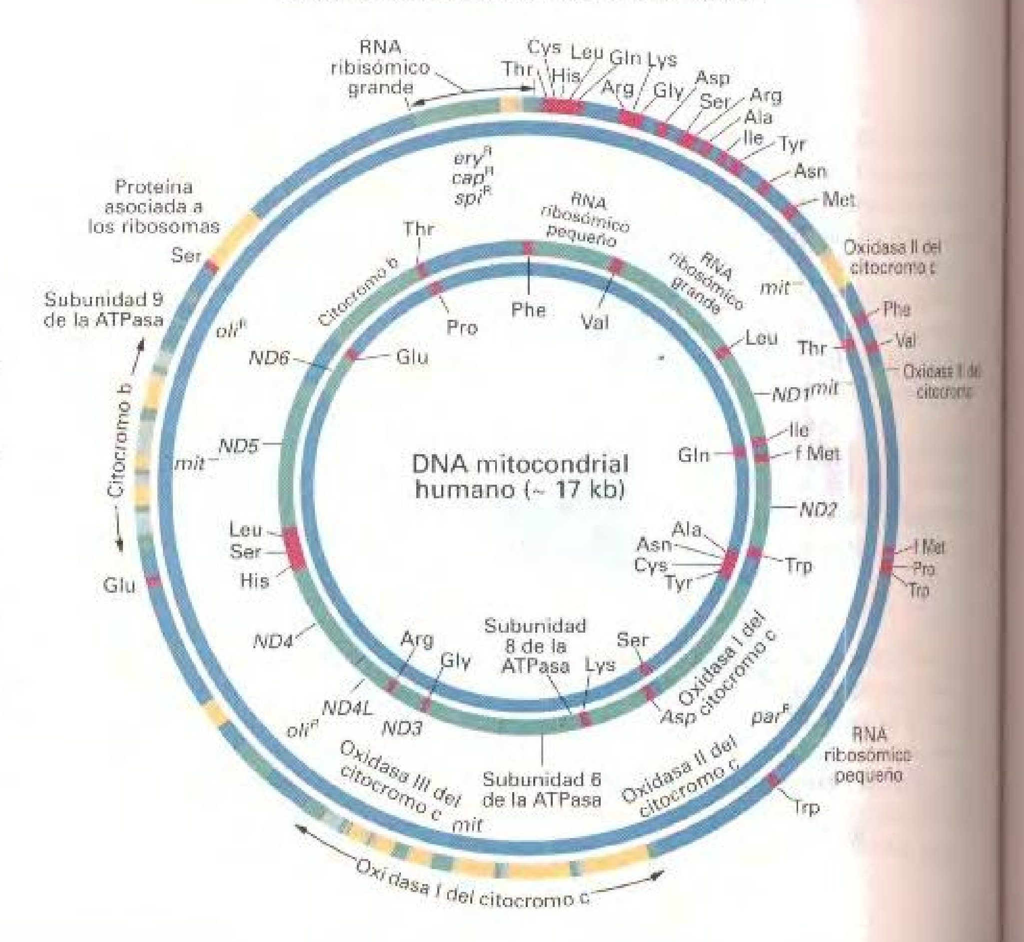


Figura 21-3. Mapa de los mtDNA humano y de levadura. Los mapas se muestran como dos círculos concéntricos, cada uno de los cuales se corresponde con una de las dos cadenas de la hélice de DNA. Observe que los mutantes utilizados en el análisis del mtDNA de levadura se muestran frente a sus correspondientes genes estructurales. Verde = exones y genes no interrumpidos, rojo = genes de tRNA y amarillo = URF (secuencias de lectura abierta con función desconocida). Los genes de los tRNA se indican con las abreviaturas de los aminoácidos que cargan; los genes ND determinan subunidades de la deshidrogenasa del NADH. (Observe que el mapa humano está dibujado a una escala distinta del de levadura.)

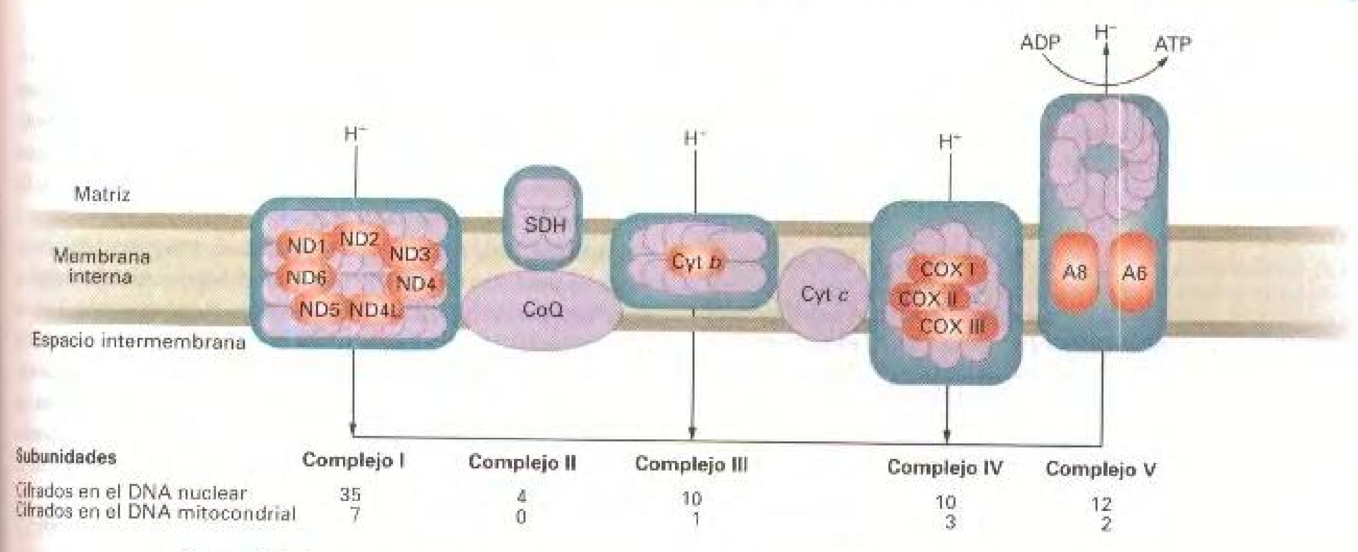


Figura 21-4. Cadena respiratoria de la mitocondria. Las subunidades cifradas en el DNA nuclear se indican en morado y las determinadas por el mtDNA en rojo. Los protones (H^+) son bombeados a través de los complejos I, III y IV desde la matriz al espacio intermembrana, y vuelven a introducirse en la matriz a través del complejo V (sintetasa de ATP), con la producción concomitante de ATP. El coenzima Q10 (CoQ) y el citocromo *c* (Cyt *c*) son proteínas cifradas en el núcleo que están implicadas en la transferencia de electrones. ND, deshidrogenasa del NADH; SDH, deshidrogenasa del succinato; COX, oxidasa del citocromo; A6 y A8, subunidades del complejo V, sintetasa de ATP. (Adaptado de S. DiMauro et al., «Mitocondria in Neuromuscular Disorders», *Biochimica et Biophysica Acta* 1366, 1998, 199-210.)

Genomas mitocondriales

La Figura 21-3 muestra los genomas mitocondriales humano y de levadura. Esta representación del genoma mitocondrial pone de manifiesto dos funciones principales: (1) cifra algunas de las proteínas que constituyen el sistema de fosforilación oxidativa y (2) cifra los tRNA, los rRNA y algunas proteínas utilizadas en la síntesis de las proteínas mitocondriales.

Con todo, resulta sorprendente que no todos los componentes del sistema de fosforilación oxidativa estén cifrados en el mtDNA. El resto de las proteínas están determinadas por genes nucleares y sus mRNA se traducen en los ribosomas del citosol, fuera de la mitocondria. Las proteínas sintetizadas en estos ribosomas citosólicas son transportadas a la mitocondria y el sistema completo se ensambla en la membrana mitocondrial interna (Fig. 21-4).

Los mapas de la Figura 21-3 muestran los genes de 25 tRNA mitocondriales de levadura y 22 humanos. Estos tRNA llevan a cabo toda la traducción que tiene lugar en las mitocondrias. Son bastantes menos del mínimo de 32 que se requieren para traducir los mRNA nucleares. La economía se consigue por medio de un titubeo «más permisivo» en el emparejamiento de los anticodones de los tRNA (véase el Cap. 10). La Figura 21-5 muestra las especificidades de los tRNA del mtDNA humano. Observe que, en algunos casos, las asignaciones de los codones no coinciden con las del código nuclear. El código varía también entre especies diferentes. Por lo tanto, el código genético no es universal como se había supuesto durante muchos años.

Segunda letra

Primera letra	U	C	A	G	Tercera letra
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	*Stop*	(*Stop*) Trp	A
	Leu	Ser	*Stop*	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile (Met)	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	(Ile) Met	Thr	Lys	(Arg) *Stop*	A
	Ile	Thr	Lys	(Arg) *Stop*	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Figura 21-5. Código genético de la mitocondria humana. Las funciones de los 22 tipos de tRNA se muestran en los 22 recuadros que recogen codones que no son de terminación. Los casos en los que el código nuclear difiere del mitocondrial se indican en paréntesis.

El mapa presenta algunas sorpresas más. La más destacable es la aparición de intrones en varios genes mitocondriales de levadura. La subunidad I de la oxidasa de citocromo contiene nueve intrones. El descubrimiento de intrones en los genes mitocondriales de levadura es particularmente sorprendente, puesto que son relativamente raros en los genes nucleares de las levaduras. Otra sorpresa radica en la existencia de secuencias de lectura abierta con función desconocida (URF; del inglés *unassigned reading frames*) en los intrones de levadura. Las URF son secuencias que tienen codones de iniciación correctos y no están interrumpidas por codones de terminación de la traducción. Al-

gunos URF localizados dentro de intrones parecen especificar proteínas importantes en la eliminación de intrones en los RNA. Observe que el mtDNA humano es comparativamente mucho más pequeño y compacto que el de levadura. Hay mucho menos DNA espaciador entre los genes.

COROLARIO

Las mitocondrias contienen múltiples copias de mtDNA, una molécula circular con genes para componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas de las mitocondrias (principalmente rRNA y tRNA) y para subunidades de las proteínas implicadas en la producción de ATP mitocondrial. Regiones menos conocidas incluyen intrones, secuencias de lectura abierta con función desconocida y DNA espaciador.

Genomas cloroplásticos

La Figura 21-6 muestra la organización y funciones de la mayoría de los genes del cpDNA de la hepática *Marchantia polymorpha*. Por lo general, las moléculas de cpDNA oscilan en tamaño desde las 120 a las 200 kb, según la especie vegetal. En *Marchantia*, el tamaño es de 121 kb.

La molécula de *Marchantia* contiene unos 136 genes, que incluyen a los de cuatro tipos de rRNA, 31 de tRNA y alrededor de 90 de proteínas. De estos últimos, 20 determinan funciones relacionadas con la fotosíntesis y el transporte de electrones. Los genes implicados en las funciones de traducción constituyen alrededor de la mitad del genoma del cloroplasto, y entre ellos tenemos los de las proteínas y los RNA necesarios para la traducción en el orgánulo

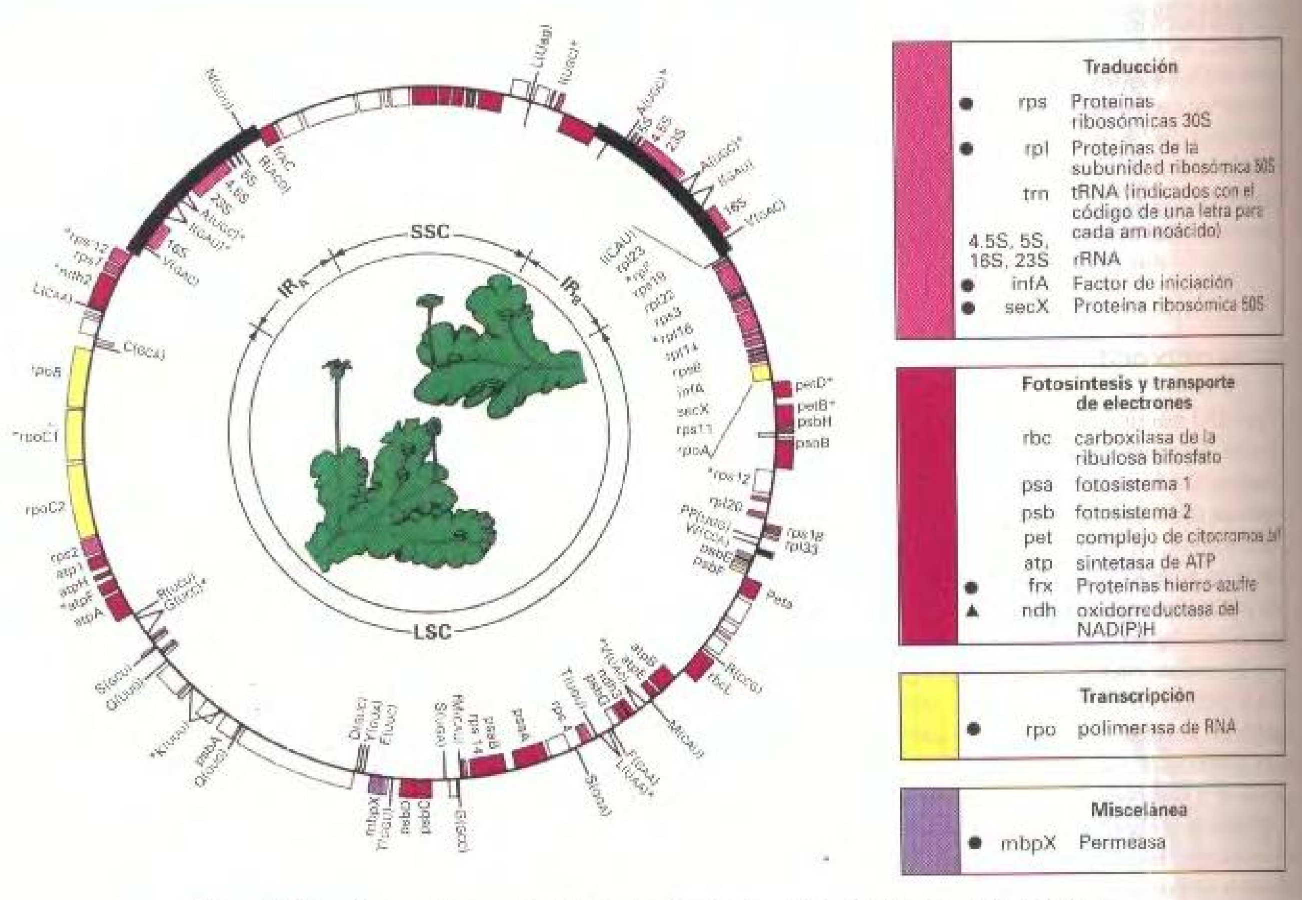


Figura 21-6. Genoma del cloroplasto de la hepática *Marchantia polymorpha*. IR_A e IR_B, LSC y SSC en el círculo interno representan las repeticiones invertidas, las regiones de copia única grande y las regiones de copia única pequeña, respectivamente. Los genes situados en la parte interna del mapa se transcriben en el sentido de las agujas del reloj, y los de la parte externa, en el sentido contrario. Los genes de los rRNA de las regiones IR se indican como 16S, 23S, 4.5S y 5S. Los genes de los tRNA están representados por la letra del aminoácido correspondiente (código de una letra) y el anticodón. Los genes que determinan proteínas identificadas se indican con los símbolos genéticos y los recuadros no coloreados restantes representan ORF sin identificar, a una escala aproximada. Los genes que contienen intrones se indican con un asterisco. Los recuadros situados a la derecha del mapa genético resumen las funciones de los genes identificados hasta la fecha. Los genes con funciones relacionadas se muestran con el mismo color. Los genes identificados por su homología con genes bacterianos o de las mitocondrias se indican con ● y ▲, respectivamente. El dibujo del centro del mapa representa una planta masculina de *Marchantia* *(arriba)* y otra femenina *(abajo)*. Los anteridios y los arquegonios se sitúan sobre unos pedúnculos especializados que sobresalen del talo, donde están los cloroplastos. *Marchantia* puede reproducirse también asexualmente: unos discos de tejido verde (yemas) crecen en la parte inferior de unas estructuras en forma de cáliz presentes en la superficie del talo. Cuando maduran, las yemas se separan del talo y crecen hasta producir nuevas plantas gametofíticas. (Tomado de K. Umesono y H. Ozeki *Trends in Genetics* 3, 1987.)

Observe en la Figura 21-6 la presencia de una gran repetición invertida. Estas repeticiones invertidas se encuentran en los cpDNA de prácticamente todas las especies vegetales. Sin embargo, hay alguna variación en cuanto a los genes incluidos en la región repetida y, por tanto, en el tamaño relativo de la misma. Uno de los misterios de la repetición invertida está en que las duplicaciones constan de la misma secuencia dentro de una especie, aunque hasta la fecha no se conoce el mecanismo que asegura esta identidad total.

Al igual que ocurre con el mtDNA, el cpDNA coopera con el DNA nuclear proporcionando subunidades para la formación de proteínas funcionales que son utilizadas dentro del orgánulo. Los componentes nucleares se traducen fuera, en el citosol, y son transportados al cloroplasto, donde se ensamblan junto a los componentes sintetizados en el orgánulo.

COROLARIO

Los cloroplastos contienen múltiples copias de cpDNA, una molécula circular con los genes para la fotosíntesis, el transporte de electrones y la síntesis de proteínas del cloroplasto. Casi todos los cpDNA presentan un repetición invertida.

Mutaciones en los orgánulos

Como sucede con los genes nucleares, los genes de los orgánulos sufren también mutaciones. De hecho, en el mtDNA de los mamíferos, la tasa de sustitución de pares de bases es aproximadamente 10 veces mayor que la de los genes nucleares. (El DNA de los orgánulos de las plantas no muestra tasas tan elevadas). También se observan deleciones y otras reorganizaciones.

Muchos de estos cambios en el DNA se expresan como fenotipos anormales en las células y en los organismos. Puesto que los orgánulos producen energía, un fenotipo mutante típico está relacionado con una deficiencia energética que conlleva crecimiento lento y apariencia enfermiza. Las mutaciones en los genes para los componentes del transporte de electrones son a menudo de este tipo. Las mutaciones en los genes que determinan rRNA o proteínas ribosómicas dan lugar generalmente a resistencia a fármacos concretos, tales como la estreptomicina o la eritromicina, antibióticos que ejercen su efecto uniéndose a los ribosomas. Las mutaciones en el DNA de los cloroplastos producen a veces un color blanco en la planta, que indica la ausencia de la clorofila, el pigmento fotosintético verde. A continuación se indican algunos ejemplos de mutantes en mitocondrias y cloroplastos.

Uno de los primeros mutantes mitocondriales en ser descubierto fue un mutante de crecimiento lento del hongo *Neurospora*. Debido a su crecimiento lento, este mutante recibió la denominación de poky (minúsculo). Aunque ya en el momento de su descubrimiento se pudo inferir la base mitocondrial de poky en virtud a su patrón de herencia (véase la siguiente sección), ahora se sabe que consiste en una deleción de cuatro pares de bases en el gen de la subunidad pequeña del rRNA mitocondrial. Puesto que *Neurospora* es un aerobio estricto, no puede sobrevivir sin una mitocondria funcional; de manera que ninguno de los mutantes de *Neurospora* es nulo y retiene alguna función.

En la levadura del pan, las mutaciones puntuales en los genes de algunas proteínas del transporte de electrones provocan una tasa de división celular lenta, que da lugar a colonias pequeñas (mutaciones *mit* —véase su localización en la Fig. 21-3). Las deleciones de parte o incluso todo el mtDNA producen también colonias pequeñas (denominadas petites). Las células de levadura pueden obtener ATP por fermentación, que no precisa del sistema mitocondrial de fosforilación oxidativa, así que las levaduras con estos genotipos de deleciones tan drásticas pueden sobrevivir, aunque con un nivel de actividad reducido. Los petites con deleciones parciales del mtDNA regeneran moléculas de mtDNA completas, como se muestra en la Figura 21-7.

El cpDNA del protista fotosintético *Chlamydomonas reinhardtii* ha sido objeto de análisis mutacionales intensivos, que comenzaron con el trabajo de Ruth Sager en 1954. Sager aisló un gran número de fenotipos de resistencia a antibióticos y otros fenotipos anormales y, correlacionando sus patrones inusuales de herencia con los del cpDNA, determinó que se debían casi con total certeza a mutaciones en el propio cpDNA.

En la especie humana, se ha demostrado que varias enfermedades están provocadas por mutaciones en el mtDNA. En general, estas enfermedades se denominan **citopatías mitocondriales**. Los órganos más afectados por estas enfermedades son aquellos en los que hay una demanda de energía elevada, principalmente los músculos y el sistema nervioso. Las mutaciones son de tipo puntual en genes mitocondriales individuales o grandes deleciones. La Figura 21-8 muestra las posiciones de algunas de estas mutaciones. Las deleciones comunes suelen aparecer por entrecruzamiento entre repeticiones directas (Fig. 21-9). (Este mismo mecanismo se ha detectado también en el mtDNA de hongos y el cpDNA de plantas, en los que se han encontrado tanto el producto circular grande como el pequeño).

La epilepsia mioclónica y enfermedad de las fibras rojas rotas (MERRF, del inglés *myoclonic epilepsy and ragged red fiber*

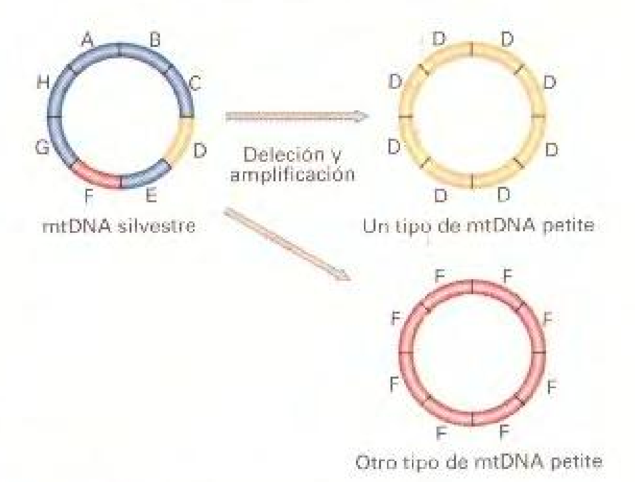
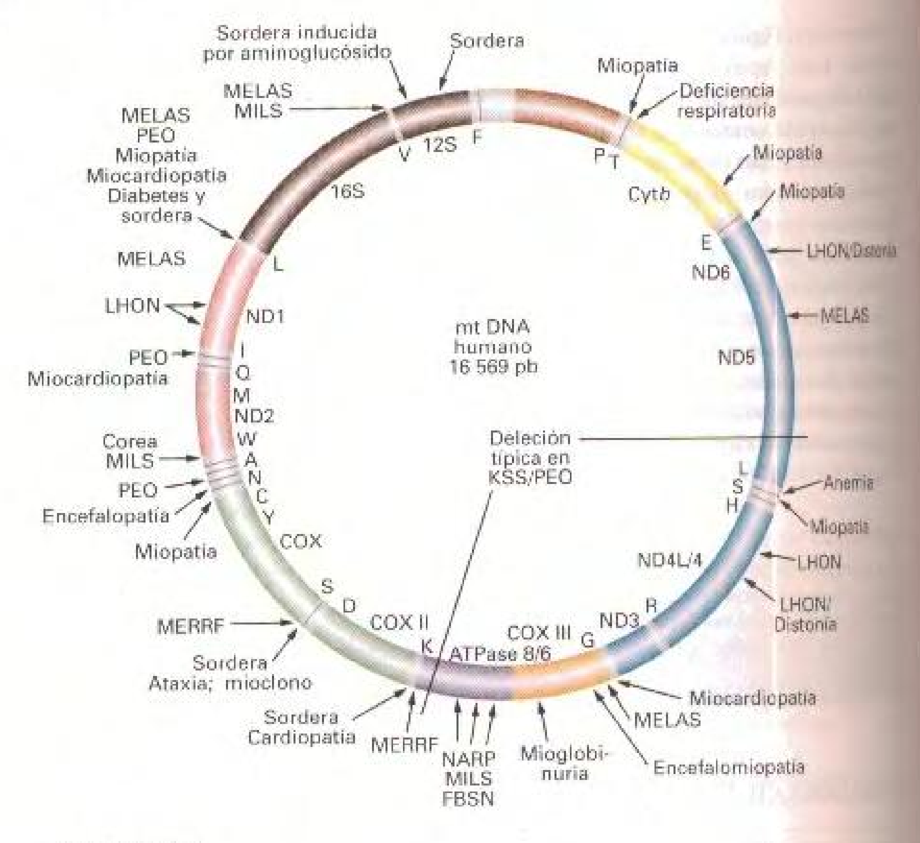


Figura 21-7. Cuando se produce un petite a partir de una célula silvestre, se puede llegar a delecionar una región grande del mtDNA. La región de DNA que queda en el petite (D o F en estos ejemplos) se amplifica mediante duplicaciones en tándem hasta llegar a formar un cromosoma de longitud aproximadamente normal.



Enfermedades:

MERRF	Epilepsia mioclónica y enfermedad de las fibras rojas rotas
LHON	Neuropatía óptica hereditaria de Leber
NARP	Debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentaria
MELAS	Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y síntomas similares a golpes
MMC	Miopatía y cardiopatía de herencia materna
PEO	Oftalmoplejía externa progresiva
KSS	Síndrome de Kearns-Sayre
MILS	Síndrome de Leigh de herencia materna

Figura 21-8. Mapa del DNA mitocondrial (mtDNA) humano que muestra los loci de las mutaciones que causan citopatías. Los aminoácidos se indican con un código de una sola letra. ND, deshidrogenasa del NADH; COX, oxidasa del citocromo; 12S y 16S, rRNA ribosómicos. (Adaptado de S. DiMauro et al., «Mitocondria in Neuromuscular Disorders», *Biochimica et Biophysica Acta* 1366, 1998, 199-210.)

disease) es un ejemplo de enfermedad humana que resulta de una mutación mitocondrial puntual —en este caso, casi siempre una sustitución de G por A en la posición 8344 del gen del tRNA para la lisina. Se trata de una enfermedad del músculo, pero los síntomas incluyen también desórdenes en la visión y la audición. Las fibras rojas musculares desgarradas carecen de fosforilación oxidativa.

El síndrome de Kearns-Sayre (KS) consiste en un conjunto de síntomas que afectan a los ojos, a los músculos, al corazón y al cerebro. Está casi siempre asociado a una deleción en el mtDNA.

Las mutaciones en los componentes nucleares del sistema de fosforilación oxidativa de las mitocondrias y de los complejos fotosintéticos de los cloroplastos dan lugar a muchos de los mismos tipos de expresión fenotípica que los de sus equivalentes cifrados en los orgánulos. Por ejemplo, los mutantes vegetales carentes de clorofila se deben a menudo a anomalías en los genes nucleares que determinan algunos aspectos de la estructura o función de la clorofila (Fig. 21-10). Estas mutaciones, sin embargo, se heredan de forma mendeliana estricta, como cabe esperar de los genes nucleares, y no de la manera no mendeliana que se describe en la siguiente sección.

COROLARIO

Las mutaciones en los orgánulos pueden dar lugar a crecimiento anormal, cantidades anormales de las proteínas de los orgánulos, transporte de electrones defectuoso, resistencia a antibióticos y (en el caso del cpDNA) fotosíntesis anormal.

Herencia de los genes y mutaciones de los orgánulos

Trataremos tres aspectos de la herencia: la expresión, la segregación citoplásmica y la herencia materna (Fig. 21-11). En el primer caso, puesto que una célula contiene muchas copias del DNA de los orgánulos, es difícil ver intuitivamente cómo una mutación que afecta a la expresión puede tener influencia sobre el fenotipo de la célula o del organismo. Además, debemos recordar que este DNA se replica incluso en las células que ya no se están dividiendo. Tendremos en cuenta algunos posibles destinos del DNA mutante de los orgánulos dentro de la célula.

En segundo lugar, una célula en la que coexisten tanto el DNA silvestre de los orgánulos como el mutante recibe la denominación de **heteroplasmonte** o, en ocasiones, la de citoheteró-

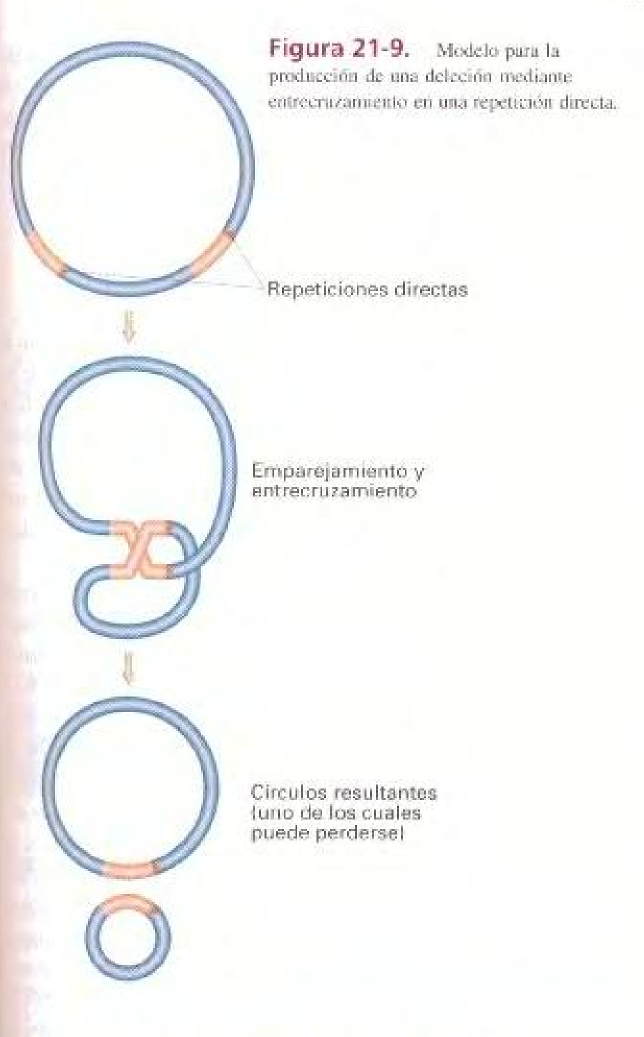


Figura 21-9. Modelo para la producción de una deleción mediante entrecruzamiento en una repetición directa.

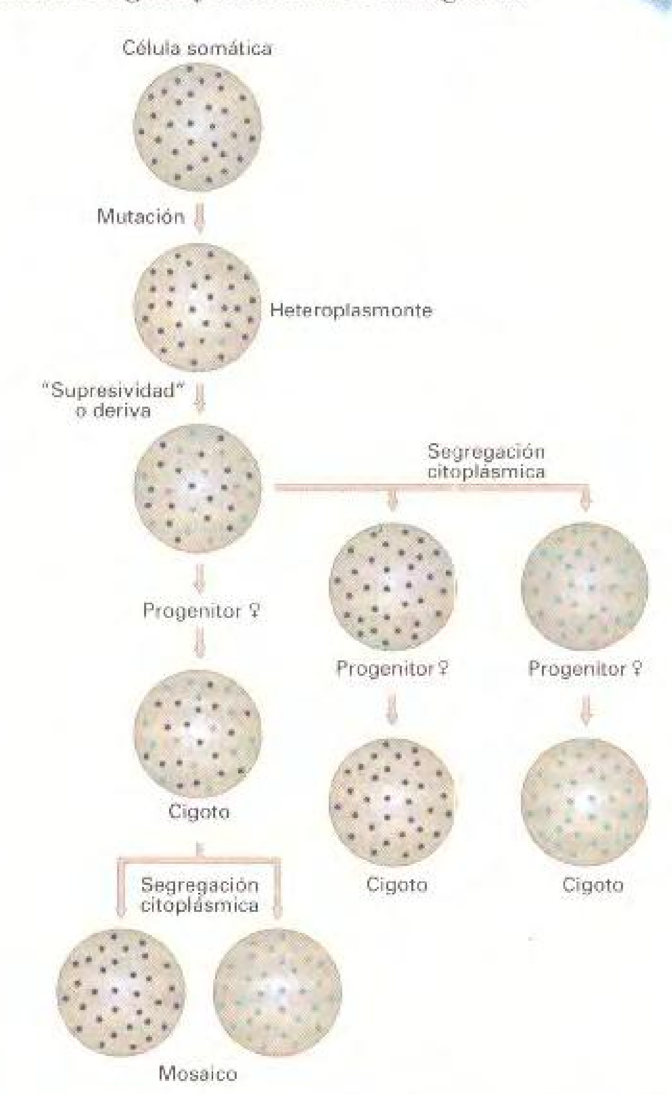


Figura 21-11. Destino genético de una mutación en el DNA de un orgánulo.

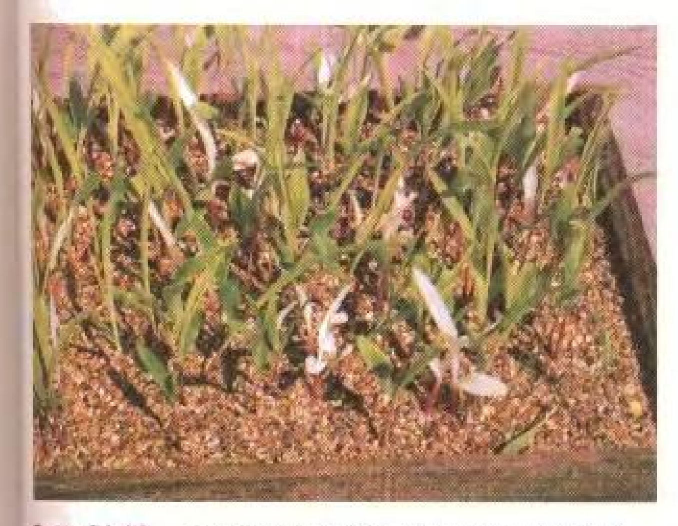


Figura 21-10. Las mutaciones en ciertos genes nucleares pueden dar lugar a hojas de color blanco. En la figura, se autofecundó una planta verde de maíz *C/c*, heterocigótica para un alelo recesivo que determina hojas albinas. 1/4 de la descendencia fue *c/c*, completamente albina. Puesto que no pueden realizar la fotosíntesis, estos albinos mueren tan pronto como agotan la reserva de nutrientes de la semilla (depositados por la planta materna). Estas mutaciones pueden afectar a la propia síntesis de la clorofila o a cualquiera de las proteínas nucleares que interaccionan con las proteínas cifradas por el cloroplasto para producir una reacción fotosintética funcional. (Anthony Griffiths.)

carionte. Cuando los heteroplasmontes se dividen asexualmente, se observa que las células hijas contienen únicamente uno de los dos tipos de DNA en los orgánulos. Este tipo de herencia se denomina **segregación citoplásmica**. Veremos cómo podría tener lugar esta segregación.

El tercer aspecto de la herencia tiene que ver con la transmisión durante el ciclo sexual. Los orgánulos están localizados en el citoplasma, de manera que se esperaría que mostraran un patrón de herencia característico de esta localización. En el cigoto de un organismo heterogamético (posee gametos masculino y femenino de tamaños distintos), prácticamente todo el citoplasma deriva de un óvulo materno. Por lo tanto, cabe esperar que los orgánulos, sus DNA y las mutaciones en éstos sigan esta línea de transmisión citoplásmica. Este tipo de herencia recibe la denominación de **herencia materna**.

Vamos a tratar estos tres procesos con mayor detalle.

Expresión de las mutaciones de los orgánulos

¿Cómo puede una mutación incrementar su frecuencia desde 1 en varios cientos o miles hasta un estado en el que se pueda

expresar fenotípicamente? Existen tres hipótesis, al menos, para explicar este incremento.

En primer lugar, algunas mutaciones de los orgánulos son **supresivas**. Esta palabra no significa que actúen como supresoras (véase el Cap. 4). En este caso, la «supresividad» significa que pueden replicarse más eficazmente que los genomas silvestres de los orgánulos. Esta actividad de las mutaciones mitocondriales resulta inesperada; después de todo, nuestra experiencia con los genes nucleares es que los mutantes mueren o aparecen con baja frecuencia. Sin embargo, parece ser característico de ciertos tipos de mutantes en los genomas de los orgánulos el que puedan acabar predominando dentro de la célula en la que aparecen. Una segunda posibilidad, para la que disponemos de apoyo experimental, es que la frecuencia de los tipos de mtDNA puede aumentar o disminuir únicamente por un efecto aleatorio (denominado **deriva aleatoria**). A veces, la frecuencia deriva con tanta rapidez que uno de los tipos de mtDNA es completamente eliminado. Una tercera posibilidad es que las mitocondrias que contengan ciertos tipos de mutaciones posean un mecanismo para reconocer que existe un posible defecto energético y comiencen a replicarse más rápidamente.

Examinemos algunos casos de mutaciones supresivas en los orgánulos. El primer ejemplo en describirse fue una clase de mutaciones *petite* en la levadura del pan denominadas *petite supresivas*. Cuando las células petite de este tipo se fusionan con las silvestres para dar lugar a un heteroplasmonte, las mitocondrias causantes del fenotipo petite acaban predominando en la mezcla y la mayoría de las células hijas son generalmente de fenotipo petite. Estas mutaciones *petite* son deleciones en las que el fragmento no eliminado aparece repetido en tándem. Es probable que la causa de la «supresividad» sea que haya orígenes de replicación duplicados.

En *Neurospora*, la mutación mitocondrial *abn* (anormal) tiene el mismo efecto. Si las células de este tipo se fusionan con células silvestres, incluso en proporciones muy sesgadas (digamos 10 000:1 a favor del silvestre), el micelio heteroplásmico (que, en realidad, es una célula grande) expresa con bastante rapidez el fenotipo mutante anormal, y acaba predominando el mtDNA responsable de dicho fenotipo mutante. Se puede observar el mismo efecto tras la inyección de un pequeño número de mitocondrias *abn* en una célula silvestre.

En la especie humana, se observa una situación paralela. La frecuencia de las formas de mtDNA mutantes asociadas a las citopatías mitocondriales cambia a menudo a lo largo de la vida, y partes distintas del cuerpo contienen proporciones diferentes. Esta situación es especialmente acusada en células posmitóticas (esto es, las que nunca volverán a sufrir mitosis). Por ejemplo, en un paciente con una deleción en el mtDNA se encontraron las proporciones siguientes:

músculo liso	4 %
hígado	14 %
corazón	40 %
riñón	40 %
músculo esquelético	50 %
lóbulo frontal del cerebro	44 %
cerebelo	14 %

Hay evidencia de la existencia de un **efecto umbral** para algunas citopatías; cuando la frecuencia del tipo mutante supera este nivel umbral, se expresan los síntomas de la enfermedad. Elevados niveles en lugares concretos pueden alterar de forma severa la función de órganos como el músculo.

Segregación citoplásmica

El término *segregación citoplásmica* se emplea para describir la producción de células mutantes y silvestres descendientes de un heteroplasmonte. Algunos de los mecanismos propuestos para la expresión de la mutación en la sección anterior guardan también relación con la segregación citoplásmica. Por ejemplo, si por efecto de la deriva un tipo mutante acaba predominando en una parte de un heteroplasmonte, parece probable que esta zona dará lugar a células descendientes mutantes.

La segregación citoplásmica se ha utilizado como base en la **prueba del heterocarionte**, que permite reconocer las mutaciones mitocondriales en los hongos filamentosos. Cuando aparece una mutación nueva y se sospecha que es mitocondrial se fuerza la formación de un heterocarionte con una estirpe silvestre. (Forzar significa que las dos estirpes deben llevar una mutación nuclear de auxotrofía que impide el crecimiento de ambas por separado). En la mayoría de los hongos, los núcleos nunca se fusionan o lo hacen raramente; por tanto, si se pueden recuperar células que llevan la mutación nuclear auxotrófica correspondiente a la estirpe silvestre y presentan el nuevo fenotipo mutante, el núcleo ha adquirido probablemente el fenotipo mutante mediante contacto citoplásmico y la posterior segregación citoplásmica. Por lo tanto, la mutación es con toda probabilidad mitocondrial. La Figura 21-12 muestra este proceso.

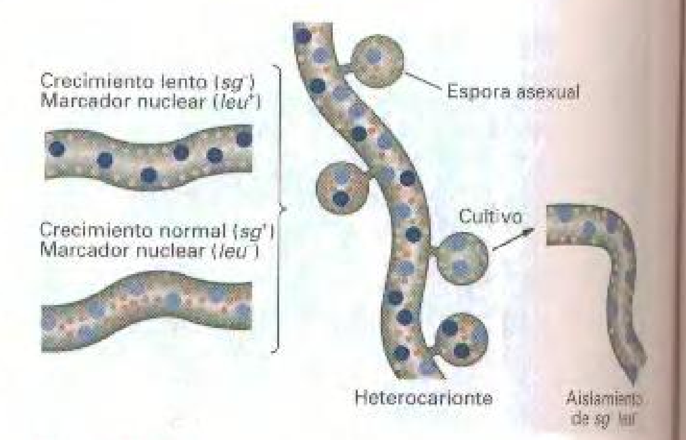


Figura 21-12. La prueba del heterocarionte se emplea para detectar herencia extranuclear en los hongos filamentosos. Se combina una estirpe con una posible mutación extranuclear (en este caso, sg^-, que da lugar a crecimiento lento, indicada por los puntos de color naranja claro) con una estirpe que lleva una mutación nuclear (leu^-, indicada por los círculos de color morado claro) para producir un heterocarionte. Se aíslan cultivos leu^+ a partir del heterocarionte. Si algunos de estos cultivos son también de fenotipo sg^-, es muy probable que *sg* sea un gen extranuclear, presente en un orgánulo. Como en el heterocarionte no se produce normalmente por recombinación nuclear, el fenotipo sg^- debe haberse adquirido por contacto citoplásmico.

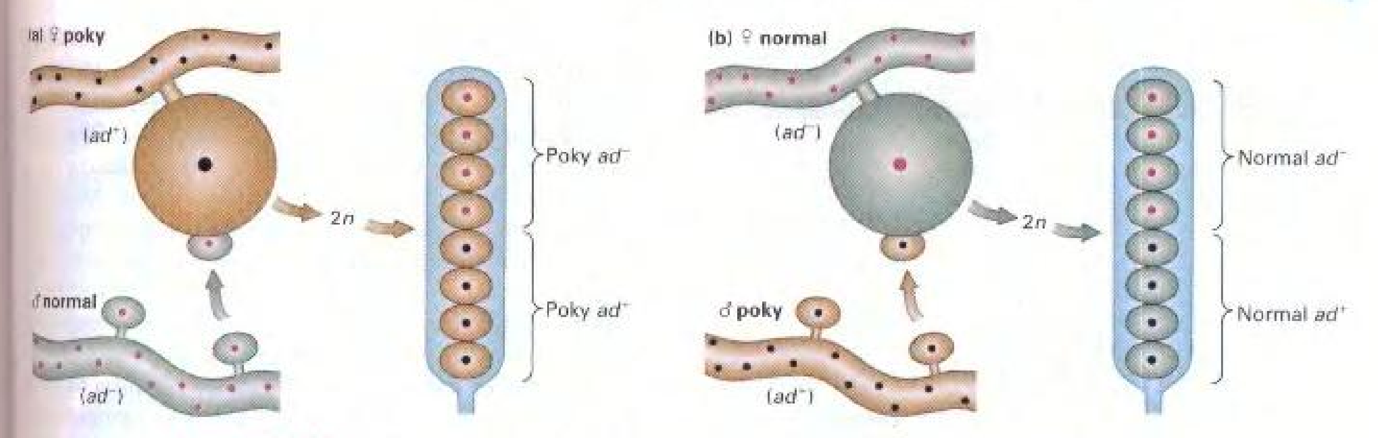


Figura 21-13. Explicación de los resultados distintos obtenidos en los cruzamientos recíprocos entre una estirpe de *Neurospora* poky y otra normal. El progenitor que contribuye a la mayor parte del citoplasma de las células descendientes recibe la denominación de *hembra*. La coloración marrón representa el citoplasma con los determinantes poky. El locus nuclear con los alelos ad^+ y ad^- se utiliza para ilustrar la segregación mendeliana típica 1:1 esperada para los genes nucleares.

COROLARIO

Cuando se divide una célula heteroplásmica, puede haber segregación citoplásmica para producir células hijas con uno u otro DNA del orgánulo.

Herencia materna

Este tipo de patrón de herencia se puede ilustrar con varios cruzamientos clave en el estudio de los genomas de los orgánulos.

Herencia materna en los mutantes poky de *Neurospora*. En 1952, Mary Mitchell aisló una estirpe mutante de *Neurospora* que denominó poky. Este mutante difiere del hongo silvestre en varios aspectos: presenta crecimiento lento (como se mencionó con anterioridad) y tiene cantidades anormales de citocromos mitocondriales. Como la mayoría de los organismos, la estirpe silvestre de *Neurospora* tiene tres tipos principales de citocromos, *a*, *b* y *c*. Los mutantes poky, sin embargo, carecen de citocromos *a* y *b*, y poseen un exceso de citocromo *c*.

Mitchell estableció la base citoplásmica de la mutación *poky* mediante la demostración de su herencia materna. En algunos hongos, resulta posible realizar cruzamientos en los que uno de los parentales aporta a la descendencia la mayor parte del citoplasma; este parental que aporta la mayor parte del citoplasma recibe la denominación de *parental materno*, aunque en realidad no hay parentales masculino y femenino auténticos. Mitchell demostró la herencia materna del fenotipo poky con los cruzamientos recíprocos siguientes:

♀ poky × ♂ silvestre ⟶ toda la descendencia poky
♀ silvestre × ♂ poky ⟶ toda la descendencia silvestre

En estos cruzamientos, cualquier gen nuclear para el que hubiera diferencias entre las estirpes parentales mostraba una segregación mendeliana normal, dando una proporción 1:1 en la descendencia (Fig. 21-13). Todos los descendientes poky se comportaban como la estirpe poky original, transmitiendo el fenotipo poky a lo largo de muchas generaciones cuando se cruzaban como hembras.

Herencia materna de los pigmentos de los cloroplastos en las plantas. En 1909, Carl Correns publicó unos resultados sorprendentes obtenidos de sus estudios con plantas variegadas de dondiego de noche (*Mirabilis jalapa*). Observó que la mayoría de las hojas de estas plantas variegadas presentaban parches de tejidos verdes y blancos, y que algunas ramas tenían tan sólo hojas verdes, mientras que otras únicamente mostraban hojas blancas (Fig. 21-14).

Todos los tipos de ramas tenían flores, de manera que Correns realizó distintas combinaciones de cruzamientos, transfiriendo polen desde una flor a otra. El Cuadro 21-1 muestra los resultados de estos cruzamientos. Dos aspectos de estos resultados resultan relevantes. En primer lugar, hay diferencias entre los cru-



Figura 21-14. Variegación en las hojas del dondiego de noche, *Mirabilis jalapa*. Las flores se pueden formar en cualquier tipo de rama (variegada, verde o blanca) y se pueden utilizar en cruzamientos.

CUADRO 21-1. Resultados de cruzamientos entre flores de plantas variegadas de dondiego de noche

Fenotipo de la rama que aporta el óvulo (♀)	Fenotipo de la rama que aporta el polen (♂)	Fenotipo de la descendencia
Blanco	Blanco	Blanco
Blanco	Verde	Blanco
Blanco	Variegado	Blanco
Verde	Blanco	Verde
Verde	Verde	Verde
Verde	Variegado	Verde
Variegado	Verde	Variegado, verde o blanco
Variegado	Verde	Variegado, verde o blanco
Variegado	Variegado	Variegado, verde o blanco

zamientos recíprocos: por ejemplo, el cruzamiento ♀ blanca × ♂ verde da un resultado diferente del ♀ verde × ♂ blanco. En conjunto, el fenotipo del parental materno es el único responsable de la determinación del fenotipo de toda la descendencia. El fenotipo paterno es irrelevante y su contribución a la descendencia parece ser nula. Éste es un caso de herencia materna estricta. Aunque las plantas blancas de la descendencia no viven mucho tiempo, puesto que carecen de clorofila, los restantes tipos de descendientes sí sobreviven y pueden emplearse en otros cruzamientos. En las siguientes generaciones, siempre se dan los mismos patrones de herencia observados en los cruzamientos originales.

La Figura 21-15 representa un modelo que explica todos los patrones de herencia del Cuadro 21-1. Las ramas variegadas producen aparentemente tres tipos de óvulos: algunos contienen sólo cloroplastos blancos, otros sólo verdes y otros los dos tipos. Los óvulos que tienen cloroplastos verdes y blancos producen cigotos que también presentan ambos tipos de cloroplastos. En las divisiones mitóticas posteriores, los cloroplastos verdes y los cloroplastos blancos segregan en algunas líneas celulares, dando lugar de esta manera al fenotipo variegado. En este ejemplo,

Figura 21-15. Modelo basado en la herencia autónoma de los cloroplastos, que explica los resultados de los cruzamientos en *Mirabilis jalapa*. Los círculos grandes y oscuros son núcleos. Los corpúsculos más pequeños son los cloroplastos, verdes o blancos. Se supone que cada óvulo contiene muchos cloroplastos y que el polen no lleva ninguno. Los dos primeros cruzamientos muestran herencia estrictamente materna. Si la rama materna es variegada, se pueden producir tres tipos de cigotos, dependiendo de si el óvulo contiene sólo cloroplastos blancos, sólo verdes o de los dos tipos. En este último caso, el cigoto resultante puede producir tejido de los dos tipos, blanco y verde, por lo que da lugar a una planta variegada.

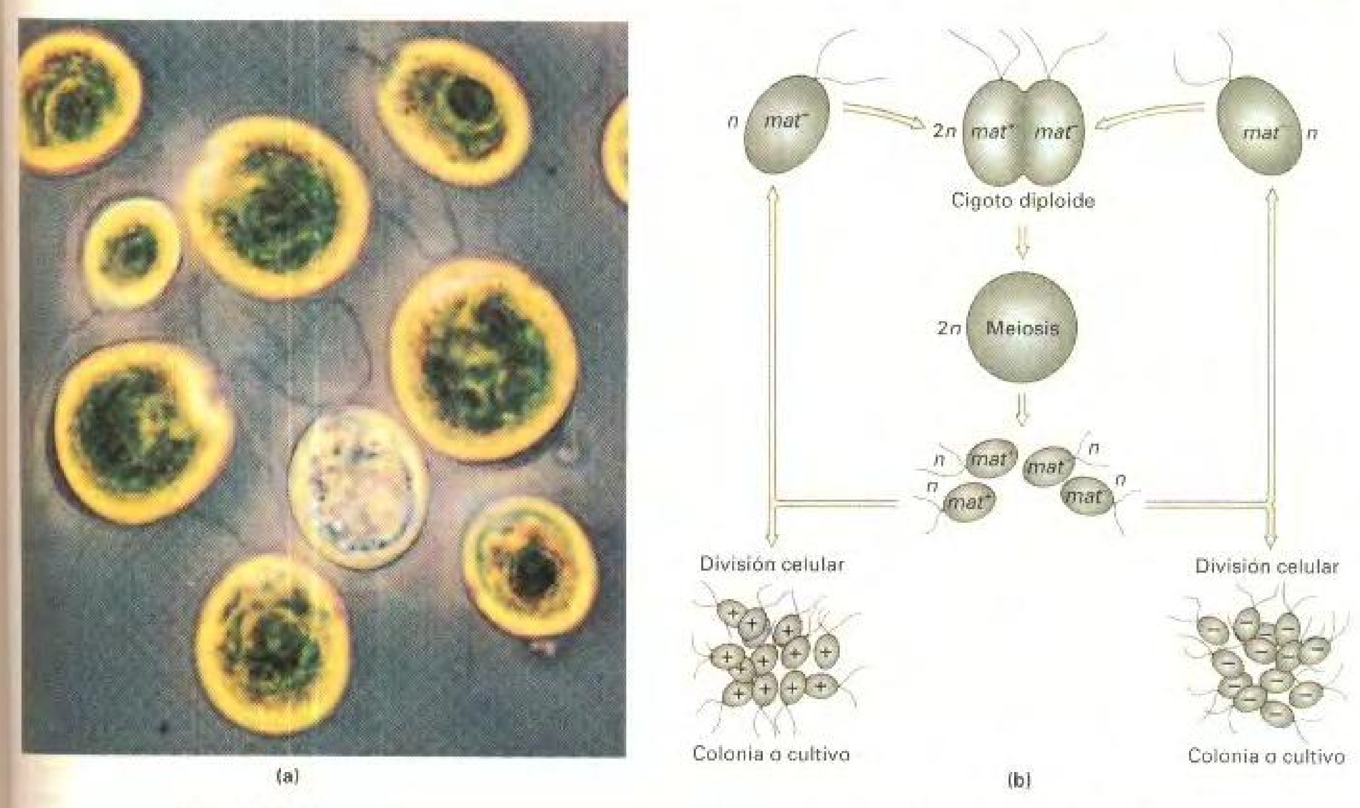


Figura 21-16. (a) Células vivas del protista fotosintético *Chlamydomonas reinhardtii*. Observe el par de flagelos y el gran cloroplasto único. (b) Ciclo de vida de *Chlamydomonas*. Todos los cigotos diploides son heterocigóticos para los alelos del tipo sexual mat^{+} y mat^{-}, puesto que sólo se pueden cruzar las algas que difieren en estos alelos.

Observamos una vez más el fenómeno de la segregación citoplásmica.

En la mayoría de las plantas, los orgánulos se heredan del parental materno. Sin embargo, hay algunas notorias excepciones en las que la herencia es estrictamente paterna.

Herencia uniparental en *Chlamydomonas reinhardtii*. La Figura 21-16 muestra el ciclo de vida de *Chlamydomonas*. En 1954, Ruth Sager aisló un mutante sensible a la estreptomicina con un patrón de herencia extraordinariamente inesperado para la época. En los cruzamientos que se indican a continuación, *sm-r* y *sm-s* indican resistencia y sensibilidad a la estreptomicina, respectivamente. El gen del tipo sexual es el *mat*, con los alelos + y −. (Los cruzamientos sólo tienen lugar entre cultivos + y −).

sm-r mat^{+} × *sm-s* mat^{-} → toda la descendencia *sm-r*
sm-s mat^{+} × *sm-r* mat^{-} → toda la descendencia *sm-s*

En este caso, observamos de nuevo diferencias entre los cruzamientos recíprocos; todas las células descendientes muestran el fenotipo para la estreptomicina del parental mat^{+}. Como en el fenómeno de herencia materna, se trata de un caso de **herencia uniparental**. De hecho, Sager se refirió al tipo sexual mat^{+} como la hembra, aunque no había ninguna diferencia física observable entre los tipos sexuales, y ni siquiera existía la diferencia en la contribución de citoplasma que se observaba en *Neurospora*. En estos cruzamientos, todos los genes marcadores nucleares (como el propio *mat*) dan un comportamiento mendeliano, con segregación 1:1 en la descendencia.

Otros varios mutantes (mencionados previamente) mostraban herencia uniparental. Estos experimentos revelaron a Sager la existencia de un misterioso «genoma uniparental» en *Chlamydomonas*, es decir, un grupo de genes que muestran transmisión conjunta en los cruzamientos sólo a través de los parentales mat^{+}. Este genoma uniparental es el DNA del cloroplasto (cpDNA). Se demostró que el cpDNA del parental mat^{-} era destruido de alguna manera en el cigoto. Esta destrucción se puede demostrar fácilmente comprobando que el patrón de restricción del cpDNA en la descendencia coincide siempre con el del parental mat^{+}. Esta pérdida del cpDNA del parental mat^{-} va en paralelo con la pérdida de los genes del cpDNA (como los genes *sm*) presentes en el parental mat^{-}.

En *Chlamydomonas*, el mtDNA y sus mutaciones se heredan también de forma uniparental; aunque con cierta travesura, ya que el mtDNA se hereda del parental mat^{-}. En otras palabras, en un cruzamiento, toda la descendencia hereda el genotipo del mtDNA correspondiente al parental mat^{-}.

Herencia uniparental de las mutaciones mitocondriales en la levadura del pan. En un cruzamiento entre levaduras, las dos células parentales se fusionan y, aparentemente, contribuyen por igual al citoplasma de la célula diploide resultante (Fig. 21-17). Por consiguiente, no se espera ni se observa el tipo de herencia materna visto en *Neurospora*, basado en la contribución diferencial de citoplasma. Además, los patrones de herencia del mtDNA son independientes del tipo sexual. En este sentido, por tanto, la herencia de los orgánulos en las levaduras es bastante

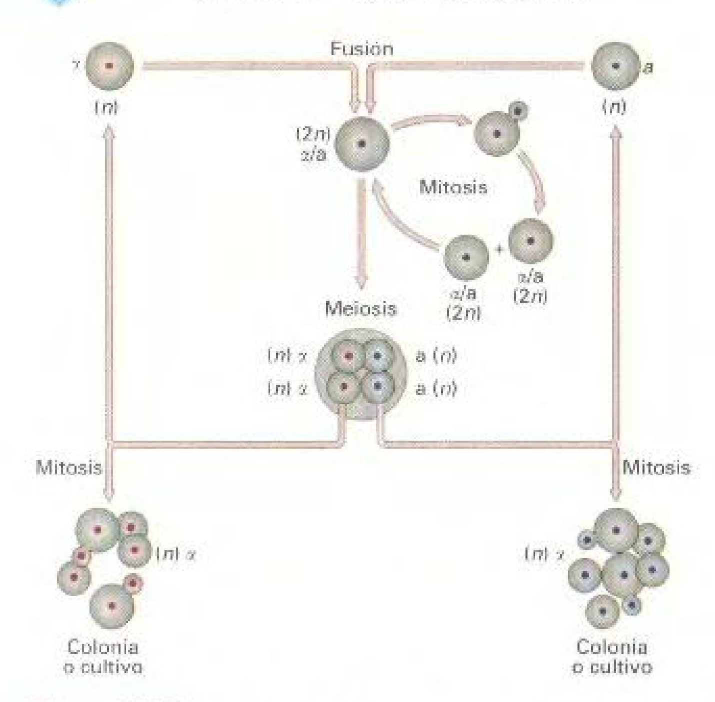


Figura 21-17. Ciclo de vida de la levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*). Los alelos nucleares *a* y *α* determinan el tipo sexual. La fusión entre una célula *a* y otra *α* produce una célula diploide. Normalmente, la célula entra a continuación en un ciclo mitótico diploide (por gemación). Sin embargo, se puede inducir (tras la siembra en un medio especial) la esporulación del diploide, para dar lugar a productos haploides. La meiosis tiene lugar durante la esporulación. Observe que la gemación consiste en la formación de una pequeña zona de crecimiento en uno de los lados de la célula progenitora; esta yema finalmente crece y se separa, constituyendo la célula hija.

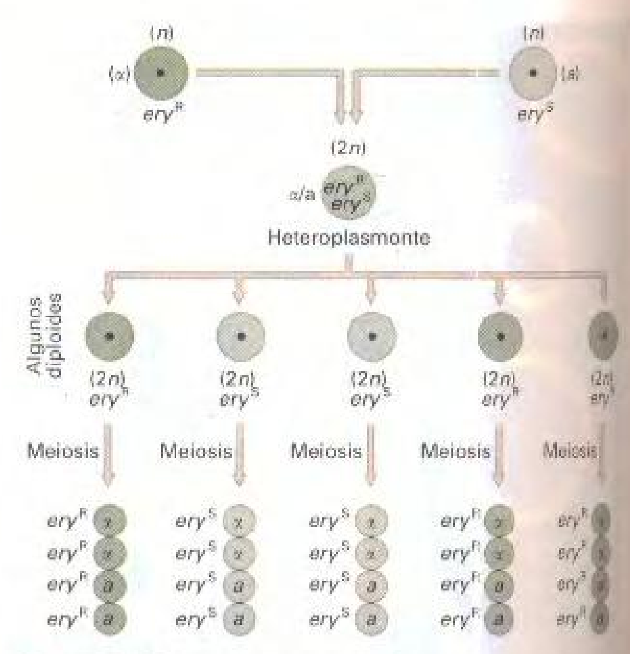


Figura 21-18. En las levaduras, ciertos fenotipos de resistencia a fármacos presentan un patrón de herencia especial. Cuando el diploide entra en meiosis, los productos de cada una de las meiosis muestran herencia uniparental. (Sólo se indica una muestra representativa de los diploides). Observe que los genes nucleares, representados en la figura por los alelos *a* y *α* del tipo sexual, segregan con un patrón de herencia estrictamente mendeliano. Los alelos ery^R y ery^S determinan, respectivamente, resistencia y sensibilidad a la eritromicina.

diferente de la de las mutaciones en el cpDNA de *Chlamydomonas*. Sin embargo, sí se da un tipo de herencia uniparental, como ilustran los siguientes ejemplos.

Si un petite carente de mtDNA se cruza con el silvestre, ninguno de los descendientes es petite. Por esta razón, estos petites se denominaron **petites neutros**. Éste es un tipo de herencia uniparental. Sin embargo, los petites supresivos sí producen descendencia petite en proporciones que correlacionan con el grado de «supresividad».

En cierto sentido, los petites son bastante atípicos entre las mutaciones mitocondriales. La resistencia a fármacos y las mutaciones puntuales *mit* muestran con mayor claridad el patrón de herencia de los genomas mitocondriales en este organismo.

La Figura 21-18 muestra la herencia de una mutación de resistencia a eritromicina. El cigoto original es realmente un heteroplasmonte, que consta de una mezcla de los citoplasmas parentales. En un cruzamiento entre levaduras, los cigotos se dividen a menudo mitóticamente como diploides antes de que tenga lugar la meiosis. Durante las divisiones mitóticas, los dos mtDNA sufren segregación citoplásmica, por lo que los meiocitos son «puros» respecto a su tipo de mtDNA y todas las esporas serán ery^R o ery^S. Por lo tanto, se muestra herencia uniparental en cada meiocito individual.

Herencia materna de las citopatías humanas. Las deleciones en el mtDNA humano tienden a tener un origen *de novo* y no se heredan de forma materna. Sin embargo, las diferentes mutaciones puntuales sí tienen herencia materna. Por ejemplo, la mutación que causa la MERRF se puede detectar durante varias generaciones a lo largo de la línea materna. Sin embargo, debido a la heteroplasmia, la segregación citoplásmica y el efecto umbral, los miembros de la familia pueden estar afectados de forma severa, mostrar únicamente síntomas débiles o no presentar en absoluto síntomas clínicos.

COROLARIO

El DNA de los orgánulos y los fenotipos asociados se heredan de forma uniparental, la mayoría de las veces de la madre.

Recombinación del DNA extranuclear

La recombinación del mtDNA puede tener lugar en heteroplasmontes «dihíbridos» para sus mitocondrias. Debe ocurrir mediante la fusión de las mitocondrias y un proceso similar al entrecruzamiento, aunque se conocen pocos detalles moleculares del proceso. En la levadura del pan, se pueden emplear los marcadores de resistencia a fármacos para demostrar este proceso, como ilustra la Figura 21-19. El diagrama muestra que la recombinación sucede en el cigoto (el heteroplasmonte). Cuando esta célula se divide mitóticamente, la segregación citoplásmica da lugar a tétradas que contienen uno de los genotipos de mtDNA parentales o uno de los tipos recombinantes recíprocos. La frecuencia de las «tétradas recombinantes» se utilizó históricamente

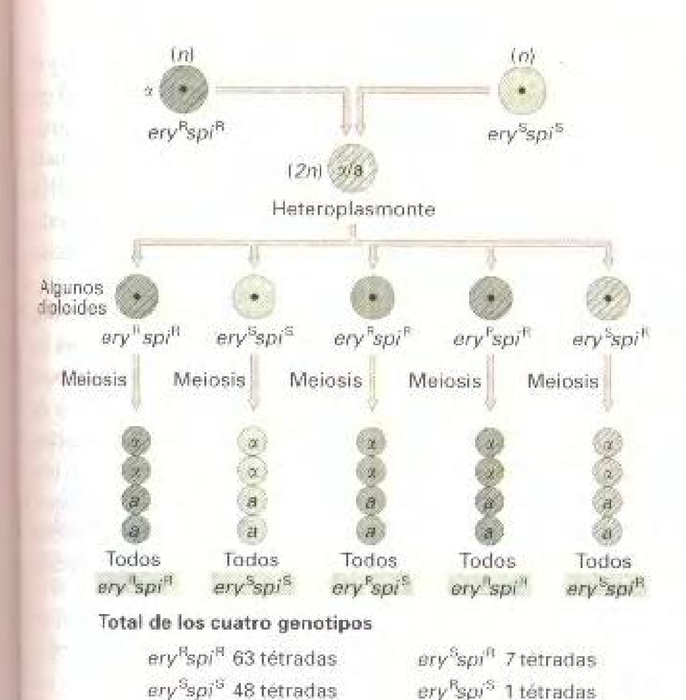


Figura 21-19. Estudio de la herencia en un cruzamiento entre células de levadura que difieren en los alelos de resistencia a dos fármacos distintos (ery^R = resistencia a la eritromicina; spi^R = resistencia a la espiramicina). Cada diploide se puede clasificar como parental o recombinante en función de estos resultados. Observe que la identidad del genotipo extranuclear de los cuatro productos meióticos confirma que la segregación y la recombinación citoplásmica debe ocurrir durante la producción de los diploides. La RF mitocondrial es igual a (7 + 1)/total.

te para cartografiar el mtDNA en unidades de recombinación, aunque la técnica tuvo un éxito limitado y fue reemplazada por las de cartografía física.

La cartografía por recombinación se intentó también en *Chlamydomonas*. Sager descubrió que, si el parental *mat*⁻ se irradiaba con luz UV, su cpDNA no se activaba y el cigoto era un heteroplasmonte. Comenzando con estos heteroplasmontes, pudo obtener células descendientes recombinantes y emplear sus frecuencias en protocolos estándar para cartografiar parcialmente el cpDNA.

Esterilidad citoplásmica masculina

La androesterilidad en las plantas tiene a menudo una causa citoplásmica y presenta herencia materna. Las plantas androestériles no producen polen funcional, pero sí dan lugar a óvulos viables. La **esterilidad citoplásmica masculina** se emplea en la agricultura para facilitar la producción de semillas híbridas, que se generan mediante cruzamientos entre dos líneas genéticamente distintas. Generalmente, estas semillas dan lugar a plantas más

Polen estéril · Polen de B · N rf/rf · S rf/rf · Línea pura B · Línea pura A
Polen estéril · Polen de D · S rf/rf · N Rf/Rf · Línea pura C · Línea pura D
Semillas del cruzamiento (A × B) producidas en un campo aislado
Semillas del cruzamiento (C × D) producidas en un campo aislado
Polen estéril · Polen de (C × D) · S rf/rf · S Rf/rf
Planta del cruzamiento (A × B) · Planta del cruzamiento (C × D)
Semillas del cruzamiento (A × B) × (C × D) producidas en un campo aislado, vendidas al agricultor y plantadas para producir maíz híbrido de cruzamiento doble con elevado rendimiento
S rf/rf Esterilidad masculina
S Rf/rf Fertilidad masculina
La mitad de las semillas son androestériles y la otra mitad fértiles
S = Citoplasma androestéril
N = Citoplasma normal
Rf = Restaurador (supresor) nuclear de S

Figura 21-20. Utilización de la androesterilidad para facilitar la producción de maíz híbrido. En este esquema, el maíz híbrido se ha generado a partir de cuatro líneas parentales puras: A, B, C y D. Estos híbridos se denominan *híbridos de cruzamiento doble*. En cada paso, se utilizan combinaciones adecuadas de genes citoplásmicos y genes nucleares restauradores para asegurar que los parentales femeninos no se autofecundarán (ya que los parentales masculinos tendrán polen fértil). (Adaptado de J. Janick et al., *Plant Science*. Copyright © 1974 de W. H. Freeman and Company.)

grandes y vigorosas. El principal problema práctico en la producción de semillas híbridas está en impedir la autopolinización, que produciría semillas que no serían híbridas. La Figura 21-20 muestra un esquema de mejora genética.

Mitocondrias y envejecimiento

Entre las teorías para explicar el envejecimiento está la *teoría del desgaste*. Las células se asimilan a máquinas que, a lo largo del tiempo, acumulan daños que no pueden ser completamente reparados, de manera que, finalmente, la máquina no puede funcionar y «muere». Durante los procesos de envejecimiento de los animales, se produce una reducción en la fosforilación oxidativa, la función que se lleva a cabo en las mitocondrias. Además, durante el envejecimiento, tiene lugar también la acumulación de cierta deleción (la deleción «común» de 5 kb) y de ciertas mutaciones puntuales. Estas observaciones han sugerido la posibilidad de una conexión de las mutaciones mitocondriales y el desgaste mitocondrial con el envejecimiento. De hecho, el envejecimiento podría ser la enfermedad mitocondrial definitiva. Hay algún apoyo para esta teoría. Por ejemplo, si se elimina el mtDNA de las células humanas y se reemplaza con mtDNA de personas de edades diferentes, se observa en estas construcciones una correlación entre la edad y la fosforilación oxidativa.

Durante el envejecimiento, la acumulación de mutaciones en el mtDNA no parece alcanzar el nivel suficiente como para interferir con la fosforilación oxidativa. Si embargo, se sabe poco sobre el efecto en la célula de las moléculas defectuosas de mtDNA. Por ejemplo, si se produjera una acumulación localizada en ciertas partes de una célula o en ciertas células de un tejido, el efecto podría ser entonces mucho mayor de lo que sugería la frecuencia total. La teoría mitocondrial del envejecimiento se encuentra aún en un estado especulativo, por lo que se necesita seguir investigando sobre este asunto.

Resumen

Las mitocondrias contienen múltiples copias de un pequeño «cromosoma» circular con genes cuyas funciones están relacionadas con la fosforilación oxidativa mitocondrial y con la síntesis de las proteínas del orgánulo. El conjunto de genes mitocondriales no proporciona la serie de proteínas adecuadas para llevar a cabo estas funciones. Las otras proteínas necesarias están cifradas en el núcleo, se traducen fuera de la mitocondria y se importan a la membrana interna de ésta. Los cloroplastos contienen también muchas copias de un solo «cromosoma» circular de DNA con genes implicados principalmente en la fotosíntesis y en la síntesis de las proteínas del cloroplasto. Estos genes interaccionan también con los genes nucleares para ser completamente funcionales. La traducción en los orgánulos emplea un código genético modificado.

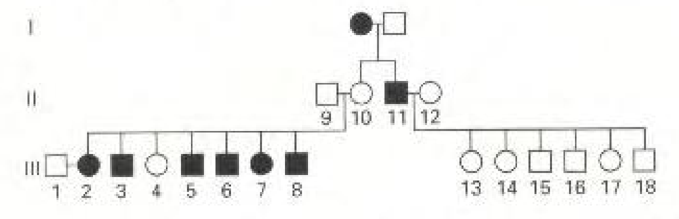
Las mutaciones en algunos genes de los orgánulos producen defectos en los sistemas de producción de energía y, por tanto, dan lugar a un crecimiento lento o anormal. Las mutaciones en los rRNA y en las proteínas ribosómicas confieren a menudo resistencia a fármacos concretos que se unen al ribosoma.

Para expresarse fenotípicamente, las mutaciones de los orgánulos deben alcanzar una frecuencia superior al umbral de expresión. Se han propuesto varios mecanismos que permiten que ocurra esto. En las células que presentan mezclas de DNA de los orgánulos mutante y silvestre, la segregación citoplásmica produce células hijas de uno u otro tipo. Cuando los individuos portadores de mutaciones en los orgánulos se utilizan como parentales de un cruzamiento sexual, generalmente, las mutaciones se transmiten exclusivamente a través del parental materno. En algunos organismos, existe un tipo especializado de herencia uniparental que no es de naturaleza materna.

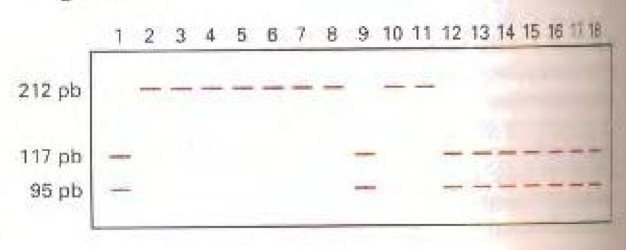
Cuando se combinan en la misma célula dos genotipos distintos de orgánulos, puede ocurrir un proceso de entrecruzamiento que da lugar a moléculas recombinantes. La frecuencia de estos recombinantes tiene alguna utilidad en la cartografía de los cromosomas de los orgánulos.

Problema de Integración de Capítulos

1. El pedigrí humano que se muestra abajo guarda relación con una anomalía visual rara, en la que la persona afectada pierde la visión central manteniendo la periférica.



a. ¿Cuál es el patrón de herencia? ¿Se puede explicar por herencia nuclear? ¿Por herencia mitocondrial? Los genetistas moleculares estudiaron el DNA mitocondrial de los 18 miembros de las generaciones II y III. Se digirió un fragmento de restricción de mtDNA de 212 pb de cada persona con otra enzima de restricción, *Sfa*N1, con el resultado siguiente:



b. ¿Qué patrón de herencia muestran estos fragmentos de restricción?

c. ¿Cómo se relaciona el patrón de herencia de los fragmentos de restricción con la herencia de la enfermedad?

d. ¿Cómo se pueden explicar los individuos 4 y 10?

e. ¿Cuál es la naturaleza más probable de la mutación?

f. ¿Cómo podría tener utilidad este análisis para el consejo genético en esta familia?

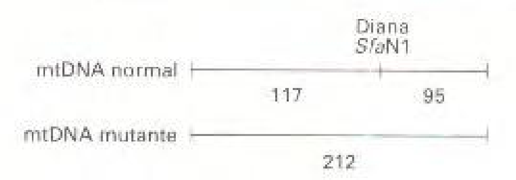
♦ Solución ♦

a. Basándose únicamente en el pedigrí, es posible, aunque improbable, que la enfermedad esté causada por un alelo nuclear dominante. Tendríamos que recurrir a la ausencia de penetrancia en el individuo 10, que debería llevar el alelo, ya que lo pasa a sus hijos. Además, tendríamos que explicar las proporciones de la generación III. Los cruzamientos 9 × 10 y 11 × 12 deberían ser *A/a* × *a/a*; y, por tanto, la relación fenotípica esperada de individuos afectados y normales en los hijos de ambas parejas sería 1:1. En conclusión, éste no es un modelo atractivo para explicar los resultados.

Los resultados se pueden explicar también por herencia materna de la enfermedad. Los individuos 4 y 10, sin embargo, requieren una explicación adicional. Una vez más, podemos recurrir a la penetrancia incompleta. No obstante, alternativamente, podemos echar mano de la segregación cioplásmica; ya que las células pueden tener mezclas de determinantes citoplásmicos normales y anormales (en este caso, las mitocondrias), y la segregación citoplásmica sesgaría la proporción de célula a célula. La madre de la primera generación debería ser heteroplásmica y, por casualidad, pasó predominantemente mitocondrias normales a su hija (10), que no expresa la enfermedad. A continuación, por un sesgo en la dirección opuesta, la mujer 10 pasaría principalmente mitocondrias anormales a seis de sus siete hijos.

b. Los patrones de restricción muestran claramente la herencia materna que se esperaba, ya que estamos tratando con mtDNA.

c. Obviamente, hay una estrecha correlación entre la presencia del fragmento grande de 212 pb y la enfermedad. Si se encontrara esta misma correlación en otros pedrigríes similares, se podría proponer un modelo en el que la mutación causaría simultáneamente la enfermedad y la pérdida de una diana de restricción *Sfa*N1.



d. La posibilidad de que 4 y 10 sean heteroplásmicos es ahora menos atractiva, puesto que si contuvieran mezclas de mitocondrias, esperaríamos encontrar algunas personas de la familia que tuviesen el patrón de restricción de tres bandas —95, 117 y 212—, hecho que no se observa. Por lo tanto, la explicación más probable es la penetrancia incompleta de una enfermedad mitocondrial.

e. De acuerdo con el modelo, el tipo más probable de mutación sería la sustitución de un par de nucleótidos, ya que si la mutación se hubiera producido en el sitio *Sfa*N1, no se perderían ni se ganarían nucleótidos, y 117 + 95 = 212.

f. Si otros estudios apoyan este modelo, la presencia del fragmento de 212 pb tras la digestión con *Sfa*N1 sería un marcador para el diagnóstico de la mutación. Todas las mujeres con este marcador podrían transmitir la enfermedad a sus hijos, mientras que los varones no la transmitirían. Observe que en la resolución de este problema, hemos combinado conceptos de herencia mendeliana, herencia citoplásmica, mutación y análisis de restricción del DNA. El problema se basa en los patrones mostrados en un pedigrí real de la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON; del inglés, *leber hereditary optic neuropathy*), que tiene una base mitocondrial.

PROBLEMAS RESUELTOS

1. En una estirpe de *Chlamydomonas* portadora del alelo *mat*⁺, se obtiene una mutación de sensibilidad a la temperatura que hace que las células no puedan vivir a temperaturas elevadas. Se cruza esta estirpe mutante con una silvestre y toda la descendencia, independientemente del tipo sexual, es sensible a la temperatura. ¿Qué puede concluir sobre esta mutación?

♦ Solución ♦

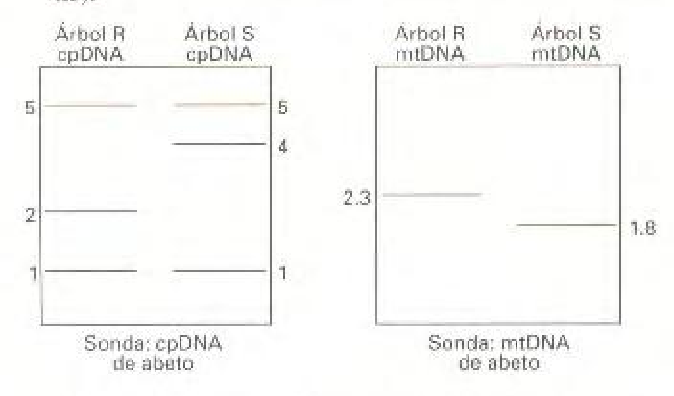
Sabemos que la mutación apareció en una estirpe mat^+. Por lo tanto, el cruzamiento debe haber sido

$$mat^+ \ ts \times mat^- \ ts^+$$

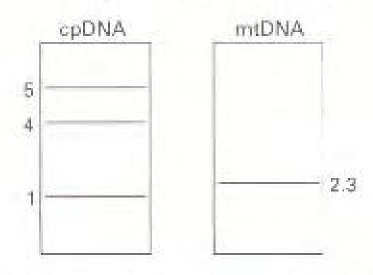
y la descendencia debe haber sido $mat^+ \ ts$ y $mat^- \ ts$. Éste es un caso claro de herencia uniparental, desde el parental mat^+ a toda la descendencia. En *Chlamydomonas*, este tipo de patrón de herencia es propio de los genes presentes en el DNA del cloroplasto. Por tanto, la mutación debe haber sucedido en el DNA del cloroplasto.

2. Debido a la conservación evolutiva, el DNA de los orgánulos muestra homología en una amplia gama de organismos. En consecuencia, las sondas de DNA derivadas de un organismo hibridan con el DNA de otras especies. Dos sondas procedentes de cpDNA y mtDNA de abeto se hibridan con un filtro que contiene los cpDNA y mtDNA digeridos con enzima de restricción de dos pinos, R y S, que se habían utilizado como parentales en un cruzamiento. A continua-

ción se presentan los autorradiogramas (los números indican kb):



Se realiza el cruzamiento R♀ × S♂, y se aíslan 20 descendientes. Todos presentan el mismo patrón de restricción con las dos sondas. Los autorradiogramas para todos los descendientes son:



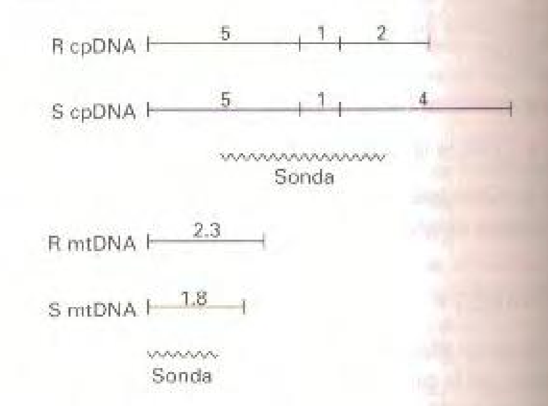
a. Explique los patrones de hibridación de los parentales y la descendencia.

b. Explique los resultados de la descendencia. Compárelos y contrástelos con los resultados que se explican en este capítulo.

c. ¿Cuál es su predicción del resultado del cruzamiento S♀ × R♂?

♦ Solución ♦

a. Tanto para el cpDNA como para el mtDNA, la cantidad total de DNA que híbrida con la sonda es diferente en las plantas R y S. Por lo tanto, podemos representar el DNA de una forma tal como la siguiente (otras organizaciones de los fragmentos también son posibles):



Las sondas, por tanto, revelan un polimorfismo (posiblemente neutro) en la longitud de los fragmentos de restricción tanto en el cpDNA como en el mtDNA. Estos RFLP son marcadores muy útiles en el cruzamiento.

b. Podemos ver que todos los descendientes han heredado su mtDNA del parental materno R, ya que todos presentan el mismo fragmento de mtDNA R hibridando con la sonda. Este resultado es el que cabía esperar, a la vista de la mayoría de casos de herencia materna que hemos tratado en este capítulo. Sin embargo, aparentemente, el cpDNA se hereda exclusivamente de forma paterna, ya que toda la descendencia muestra el patrón 5/4/1 del parental paterno S. Esta herencia paterna es sorprendente, pero es la única explicación para los resultados. De hecho, todas las gimnospermas estudiadas hasta ahora presentan herencia paterna del cpDNA. Se desconoce la causa, pero el fenómeno contrasta con lo que ocurre en las angiospermas.

c. A partir de este cruzamiento, podemos predecir que toda la descendencia mostrará el patrón paterno 5/2/1 en el cpDNA y la banda materna de 1.8 kb en el mtDNA.

PROBLEMAS

1. ¿Cómo cooperan los genomas del núcleo y de los orgánulos en la fabricación de proteínas?

2. Mencione y describa dos pruebas para identificar la herencia citoplásmica.

3. ¿Cuál es la base de la variegación en el color verde-blanco en las hojas de *Mirabilis*? Si se realiza el cruzamiento siguiente:

♀ variegada × ♂ verde

¿qué tipos de descendientes cabe esperar? ¿Y en el cruzamiento recíproco?

4. En *Neurospora*, el mutante *stp* presenta un crecimiento errático de parada y avance. Se sabe que la mutación está en el DNA mitocondrial. Si se utiliza una estirpe *stp* como hembra en un cruzamiento con una estirpe normal que actúa como macho, ¿qué descendencia cabe esperar? ¿Y en el cruzamiento recíproco?

5. Si una célula de levadura portadora de una mutación de resistencia a antibiótico en su mtDNA se cruza con una célula normal y se producen tétradas, ¿qué tipos de ascas cabe esperar respecto a la resistencia?

6. Se descubre una nueva mutación de resistencia a antibiótico (ant^R) en cierta levadura. Se mutagenizan células de genotipo ant^R, obteniéndose colonias petite. Algunas de estas petite han perdido el determinante ant^R.

a. ¿Qué puede concluir sobre la localización del gen ant^R?

b. ¿Por qué no han perdido todas las petite el gen ant^R?

7. Se estudian dos variedades de maíz. Una es resistente (R) a cierto hongo patógeno y la otra sensible (S). Se realizan los cruzamientos siguientes, con los resultados que se indican:

S♀ × R♂ ⟶ toda la descendencia S
R♀ × S♂ ⟶ toda la descendencia R

¿Qué concluye sobre la localización genética de los determinantes R y S?

8. En *Chlamydomonas*, cierta sonda permite detectar un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción en el cpDNA. Se observan los dos morfos siguientes:

Morfo 1: dos bandas de 2 y 3 kb
Morfo 2: dos bandas de 3 y 5 kb

Si se realizan los cruzamientos siguientes,

mat^- morfo 1 × mat^+ morfo 2

mat^+ morfo 2 × mat^- morfo 1

¿qué descendencia cabe esperar en estos cruzamientos? Dibuje los dos morfos de DNA con las dianas de restricción y un esquema de las autorradiografías.

9. En levaduras, el siguiente cruzamiento es dihíbrido para dos genes mitocondriales de resistencia a antibióticos:

$MATa\ oli^R\ cap^R \times MAT\alpha\ oli^S\ cap^S$

(*MATa* y *MATα* son los alelos del tipo sexual de las levaduras). ¿Qué tipos de tétradas se esperan de este cruzamiento?

10. En el género *Antirrhinum*, un fenotipo amarillento de la hoja denominado prazinizans (pr) se hereda de la siguiente manera:

♀ normal × ♂ pr ⟶ 41 203 normales + 13 variegados
♀ pr × ♂ normal ⟶ 42 235 pr + 8 variegados

Explique estos resultados según una hipótesis que implique herencia citoplásmica. (Explique las dos clases de descendientes, la mayoritaria y la minoritaria).

11. Está estudiando una planta que tiene tejidos con sectores verdes y blancos. Quiere saber si este fenómeno se debe (1) a una mutación en el cloroplasto del tipo discutido en este capítulo o (2) a una mutación nuclear dominante que inhibe la producción de clorofila y está presente sólo en ciertas capas de tejidos de la planta como un mosaico. Diseñe la estrategia experimental que utilizaría para resolver este problema.

12. Se encuentra una variante enana de tomate en una línea experimental. Se utiliza como hembra para cruzarla con plantas normales y toda la descendencia F_1 es enana. Se autofecundan los individuos de la F_1 y toda la descendencia F_2 es normal. Se autofecundan los individuos de la F_2, y la F_3 que resulta es $\frac{3}{4}$ normal y $\frac{1}{4}$ enana. ¿Cómo se pueden explicar estos resultados?

13. Asuma que la planta diploide A tiene un citoplasma genéticamente diferente del de la planta B. Para estudiar las relaciones núcleo-citoplasma, piensa obtener una planta con el citoplasma de la planta A y el genoma nuclear predominantemente de la planta B. ¿Qué haría para producir dicha planta?

14. Se realizan los siguientes cruzamientos recíprocos entre dos especies de *Epilobium*:

♀*E. luteum* × ♂*E. hirsutum* ⟶ todos de porte alto
♀*E. hirsutum* × ♂*E. luteum* ⟶ todos de porte pequeño

Los descendientes del primer cruzamiento se retrocruzan como hembras con *E. hirsutum* durante 24 generaciones sucesivas. A final de este programa de cruzamientos, toda la descendencia es aún de porte alto, como los híbridos iniciales.

a. Interprete los cruzamientos recíprocos.

b. Explique por qué se llevó a cabo el programa de retrocruzamientos.

15. Una forma de androesterilidad en el maíz presenta herencia materna. Las plantas de una línea androestéril se cruzaron utilizando polen normal, obteniéndose plantas androestériles. Además, se sabe que algunas líneas de maíz llevan un alelo nuclear dominante restaurador (*Rf*) que restablece la fertilidad del polen en las líneas androestériles.

a. Las investigaciones demuestran que la introducción de alelos restauradores en las líneas androestériles no altera ni afecta al mantenimiento de los factores citoplásmicos responsables de la androesterilidad. ¿Qué tipo de resultados experimentales llevan a esa conclusión?

b. Se cruza una planta androestéril con polen de una planta homocigótica para el alelo *Rf*. ¿Cuál es el genotipo de la F_1? ¿Y el fenotipo?

c. Las plantas de la F_1 del apartado b se utilizan como hembras en un cruzamiento de prueba con polen de una planta normal (*rf/rf*). ¿Cuál será el resultado de este cruzamiento de prueba? Indique los genotipos y los fenotipos, así como el tipo de citoplasma.

d. El alelo restaurador ya descrito puede denominarse *Rf-1*. Se ha encontrado otro restaurador dominante, *Rf-2*. *Rf-1* y *Rf-2* están situados en cromosomas diferentes. Por separado o juntos, los alelos restauradores producen polen fértil. Utilizando una planta androestéril como individuo de prueba, ¿cuál sería el resultado de un cruzamiento en el que el parental masculino fuera

(i) heterocigótico en los dos loci restauradores?
(ii) homocigótico dominante en un locus restaurador y homocigótico recesivo en el otro?
(iii) heterocigótico en un locus restaurador y homocigótico recesivo en el otro?
(iv) heterocigótico en un locus restaurador y homocigótico dominante en el otro?

16. El tratamiento con estreptomicina induce la aparición de células mutantes de *Chlamydomonas* resistentes a dicho antibiótico. Durante las divisiones mitóticas posteriores, algunas de las células hijas producidas a partir de algunas de estas células mutantes muestran sensibilidad a la estreptomicina. Sugiera una posible explicación para este fenómeno.

17. En *Aspergillus*, se obtiene un micelio «rojo» en una estirpe haploide. Construye un heterocarionte con un haploide no rojo que requiere ácido *para*-aminobenzoico (PABA). A partir de este heterocarionte, obtiene algunos descendientes que requieren PABA y tienen micelio rojo, además de otros fenotipos. ¿Qué le sugiere esta información sobre el gen que determina el fenotipo rojo?

18. Adrian Srb cruzó dos especies estrechamente relacionadas, *Neurospora crassa* y *N. sitophila*. En la descendencia de algunos de estos cruzamientos apareció un fenotipo denominado aconidial (ac) que carecía de conidios (esporas asexuales). La herencia observada fue

♀*N. sitophila* × ♂*N. crassa* ⟶ $\frac{1}{2}$ ac, $\frac{1}{2}$ normal
♀*N. crassa* × ♂*N. sitophila* ⟶ todos normales

a. ¿Qué explicación tienen estos resultados? Emplee símbolos para explicar todos los elementos de su modelo.

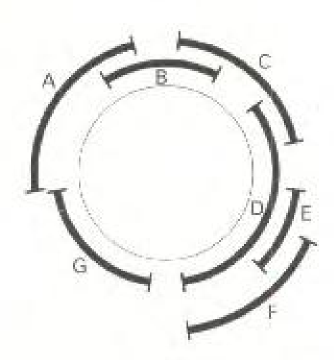
b. ¿En qué parental(es) se originaron los determinantes genéticos del fenotipo ac?

c. ¿Por qué ninguno de los parentales era ac?

19. Se realizaron varios cruzamientos entre estirpes poky y no poky (A, B, C, D y E) de *Neurospora*. Explique los resultados de los cruzamientos siguientes y asigne símbolos genéticos a cada una de las estirpes. (Observe que la estirpe poky D se comporta en todos los cruzamientos igual que la estirpe no poky A).

Cruzamiento	Descendencia
a. ♀ no poky B × ♂ poky A	todos no poky
b. ♀ no poky C × ♂ poky A	todos no poky
c. ♀ poky A × ♂ no poky B	todos poky
d. ♀ poky A × ♂ no poky C	$\frac{1}{2}$ poky, todos idénticos (p. ej., D); $\frac{1}{2}$ no poky, todos idénticos (p. ej., E)
e. ♀ no poky E × ♂ no poky C	todos no poky
f. ♀ no poky E × ♂ no poky B	$\frac{1}{2}$ poky $\frac{1}{2}$ no poky

20. Se ha caracterizado el mtDNA de siete petites citoplásmicos mediante análisis de restricción. Los resultados demuestran que el mtDNA que mantenía cada uno de los petites era el indicado por los arcos de la figura adjunta:



Se fusionaron diez mutantes *mit*⁻ con cada uno de los petites para construir heteroplasmontes, y las células de estos heteroplasmontes se sembraron en placas con medio estándar de crecimiento. De las 70 combinaciones, algunas mostraron únicamente colonias de fenotipo petite sobre la placa (representadas por un signo menos en la tabla siguiente), y las restantes presentaron algunas colonias silvestres y colonias petites (representadas por un signo más en la tabla). Las colonias silvestres deben haber aparecido por entrecruzamiento entre las mutaciones puntuales *mit* y las petite. Utilice estos resultados para localizar las posiciones aproximadas en el mtDNA de los genes que mutaron para dar lugar a los cultivos *mit*⁻ originales.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	+	–	–	–	–	–	–	–	+	+
B	–	+	+	–	–	–	–	–	+	–
C	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–
D	–	–	–	–	+	–	+	+	–	–
E	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
F	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
G	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

El problema paso a paso

1. ¿Qué es el mtDNA?

2. Dibuje una molécula de mtDNA, mostrando al menos cinco genes específicos del mtDNA.

3. ¿Qué es un petite citoplásmico?

4. ¿Qué le ocurre al mtDNA de un petite citoplásmico?

5. ¿Por qué es apropiado representar el mtDNA de un petite mediante un arco?

6. Describa brevemente el análisis de restricción que se podría haber realizado para determinar la extensión del mtDNA conservado por un petite.

7. ¿Qué es un mutante mit^-? ¿Cómo es un mutante mit^- en comparación con un mutante petite? Dibuje una colonia mit^-, una petite y una normal.

8. ¿Son los mutantes mit^- resistentes a fármacos?

9. Indique otra palabra equivalente a heteroplasmonte o confeccione su propio vocablo para describir el concepto.

10. ¿Cómo construiría los heteroplasmontes en este experimento? ¿Serían útiles los marcadores auxotróficos?

11. ¿En qué sentido se emplea el verbo *fusionar* en este problema?

12. ¿Qué les ocurre a las células de levadura en el medio de crecimiento?

13. Dibuje una placa típica representativa de un resultado + en la tabla.

14. Dibuje una placa típica representativa de un resultado – en la tabla.

15. ¿Qué significan exactamente los resultados + y –? ¿Hacen referencia a complementación o a recombinación?

16. ¿Son todos los mutantes mit^- distintos en sus comportamientos?

17. ¿Muestran todos los petites comportamientos diferentes en combinación con los mutantes mit^-?

18. ¿Cómo sería posible que algunos mutantes mit^- mostraran el mismo comportamiento, teniendo en cuenta que los petites son diferentes de acuerdo al análisis de restricción?

21. Se origina espontáneamente una estirpe de levadura haploide resistente a un antibiótico, ant^R. Se combina con una estirpe normal ant^S del tipo sexual opuesto, para formar un cultivo diploide que es inducido a entrar en meiosis. Se aíslan tres tipos de tétradas:

Tétrada 1	Tétrada 2	Tétrada 3
$\alpha\ ant^R$	$\alpha\ ant^R$	$a\ ant^S$
$\alpha\ ant^R$	$a\ ant^R$	$a\ ant^S$
$a\ ant^R$	$a\ ant^R$	$\alpha\ ant^S$
$a\ ant^R$	$\alpha\ ant^R$	$\alpha\ ant^S$

a. Interprete estos resultados.

b. Explique el origen de cada asca.

c. Si se utilizara una estirpe grande para generar petites, ¿esperaría que algunos de los petites fueran ant^S? Explique su respuesta.

22. Se obtienen dos estirpes de levadura defectivas en sus citocromos y se designan como *cyt1* y *cyt2*. Se realizan los cruzamientos siguientes.

$$cyt1^- \times cyt1^+$$
$$cyt2^- \times cyt2^+$$

Se aísla una tétrada de cada cruzamiento:

$cyt1^-$ $cyt2^-$
$cyt1^-$ $cyt2^-$
$cyt1^+$ $cyt2^-$
$cyt1^+$ $cyt2$

a. A partir de estos patrones de tétradas, explique las diferencias entre las dos mutaciones implicadas.

b. ¿Qué otros tipos de ascas esperaría en cada cruzamiento?

c. ¿Cómo podrían estar interaccionando funcionalmente los dos genes?

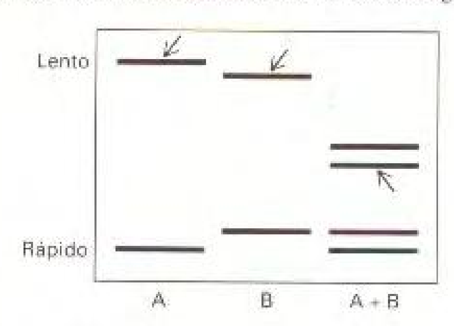
23. Se comparan los mtDNA de dos estirpes haploides de la levadura del pan. La estirpe 1 (tipo sexual α) procede de Norteamérica y la estirpe 2 (tipo sexual a) de Europa. Se emplea una enzima de restricción para fragmentar los DNA, y los fragmentos se separan por electroforesis en un gel. La muestra de la estirpe 1 produce dos bandas, una correspondiente a un fragmento muy grande y la otra a uno muy pequeño. La estirpe 2 da lugar también a dos bandas, aunque son de tamaños más intermedios. Si se realiza un análisis estándar en un diploide, ¿qué resultados espera observar en las células diploides resultantes y en las tétradas derivadas de ellas? En otras palabras, ¿qué tipos de patrones de restricción espera obtener?

24. Existen estirpes de levadura que tienen plásmidos de DNA circular de 2 micrómetros (2 μm) de circunferencia en su citoplasma. En algunas de estas estirpes, este DNA de 2 μm presenta un único sitio de restricción *Eco*RI; en otras estirpes, el plásmido contiene dos de esos sitios. Se cruza una estirpe con un sitio con una estirpe con dos sitios. Todos los diploides resultantes contienen ambos tipos de DNA de 2 μm.

a. ¿Se hereda el DNA de 2 μm de la misma manera que el mtDNA?

b. Prediga los resultados de una hibridación Southern con DNA de ascosporas de estas células diploides tratado con *Eco*RI, utilizando como sonda radiactiva un DNA de 2 μm.

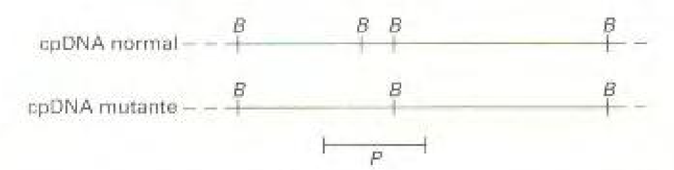
25. Se corta el DNA circular mitocondrial con dos enzimas de restricción, A y B, obteniéndose los resultados siguientes:



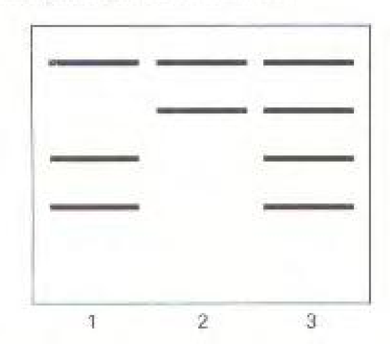
(Las flechas indican las bandas que hibridan en un Southern con una sonda radiactiva de cDNA obtenido a partir de rRNA mitocondrial). Dibuje un mapa de las posiciones de los sitios de restricción de A y B, y señale la posición aproximada del gen de rRNA.

26. Está interesado en el genoma mitocondrial de una especie de hongo en la que el análisis genético es muy complejo, pero cuyo mtDNA se puede extraer fácilmente. ¿Qué haría para localizar las posiciones de los principales genes mitocondriales en esta especie? (Asuma un cierto grado de conservación evolutiva para dichos genes).

27. **a.** En un estadio temprano en el desarrollo de una planta, una mutación en el cpDNA elimina un sitio concreto de restricción de la enzima *Bgl*II (*B*), tal y como se indica en el esquema:



En esta especie, el cpDNA presenta herencia materna. Se dejan crecer semillas de la planta y se analiza el cpDNA de la descendencia. Se cortan los cpDNA con *Bgl*II y los Southern se hibridan con la sonda P. Los autorradiogramas muestran tres patrones de hibridación:

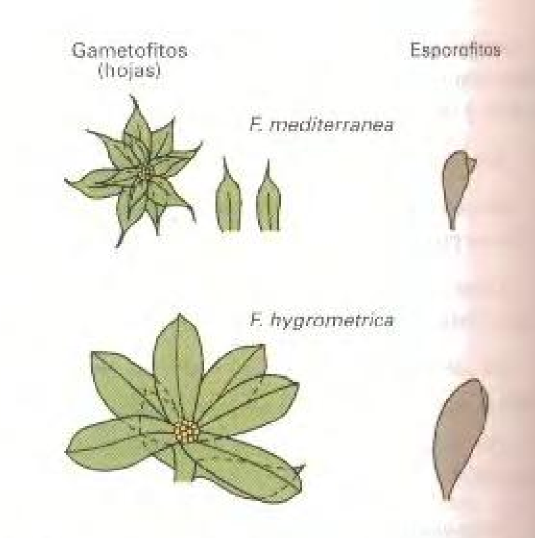


Explique la aparición de estos tres tipos de semillas.

b. En *Gryllus* (un grillo) y en *Drosophila*, se han encontrado hembras raras que presentan mezclas de dos tipos de mtDNA que difieren en la presencia o ausencia de un sitio de restricción concreto. En la descendencia de estas hembras, todos los individuos contienen también mezclas de los dos tipos de mtDNA parentales. Compare estos resultados con los del apartado a y con otros resultados presentados en este capítulo.

28. El genoma mitocondrial del nabo es una gran molécula circular, de 218 kb, con un par de repeticiones directas de 2 kb separadas por 83 kb. Sin embargo, cuando se examina cuidadosamente el mtDNA del nabo, se observan tres tipos moleculares: el círculo de 218 kb previamente descrito; un círculo de 135 kb, con una sola de las repeticiones de 2 kb, y un círculo de 83 kb, también con una sola de las repeticiones de 2 kb. Proponga un modelo que explique la presencia de los dos tipos moleculares más pequeños.

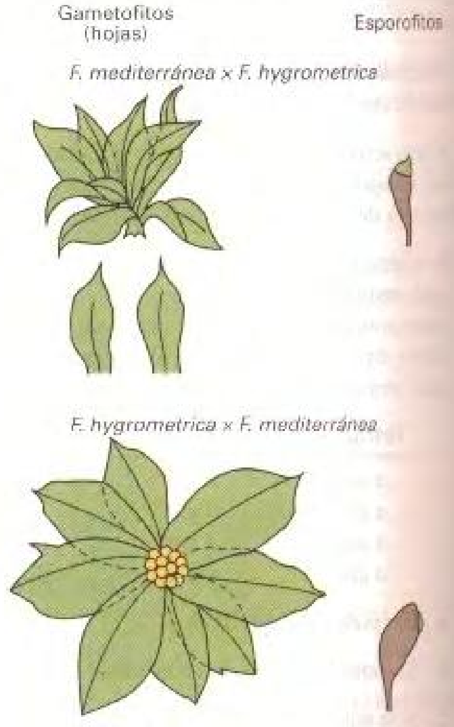
29. Se realizaron cruzamientos recíprocos y endogámicos con dos especies de musgo, *Funaria mediterranea* y *F. hygrometrica*. La figura adjunta muestra el aspecto de los esporofitos y de las hojas de los gametofitos. Los cruzamientos se describen con la hembra parental en primer lugar.



a. Describa los resultados presentados, resumiendo los hallazgos fundamentales.

b. Proponga una explicación para los resultados.

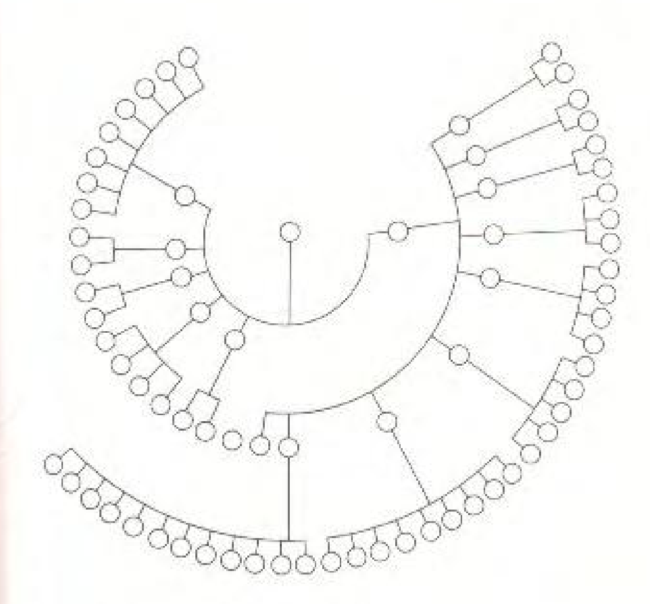
c. Indique cómo comprobaría su explicación; asegúrese de exponer cómo la podría distinguir de otras explicaciones.



(Diagramas según C.H. Waddington, An Introduction to Modern Genetics, Macmillan, 1939).

30. El pedigrí adjunto muestra un patrón de herencia muy inusual, aunque ocurre en la realidad. Se muestra toda la descendencia, aunque se han omitido los padres de cada cruzamiento para concentrar la atención sobre lo extraordinario del patrón.

a. Exponga de forma exacta y concisa qué es inusual en este pedigrí.



b. ¿Se puede explicar el patrón por

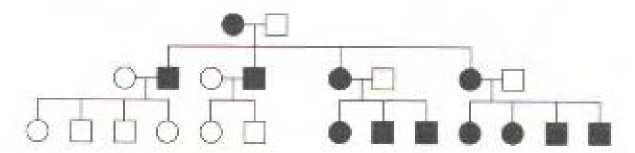
(i) casualidad (si es así, indique la probabilidad)?

(ii) factores citoplásmicos?

(iii) herencia mendeliana?

Explique su respuesta.

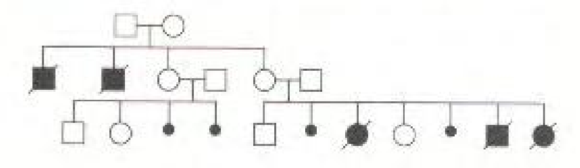
31. Considere el siguiente pedigrí para una enfermedad rara del músculo.



a. ¿Cuál es la característica inusual que diferencia este pedigrí de los que hemos estudiado en los capítulos anteriores del libro?

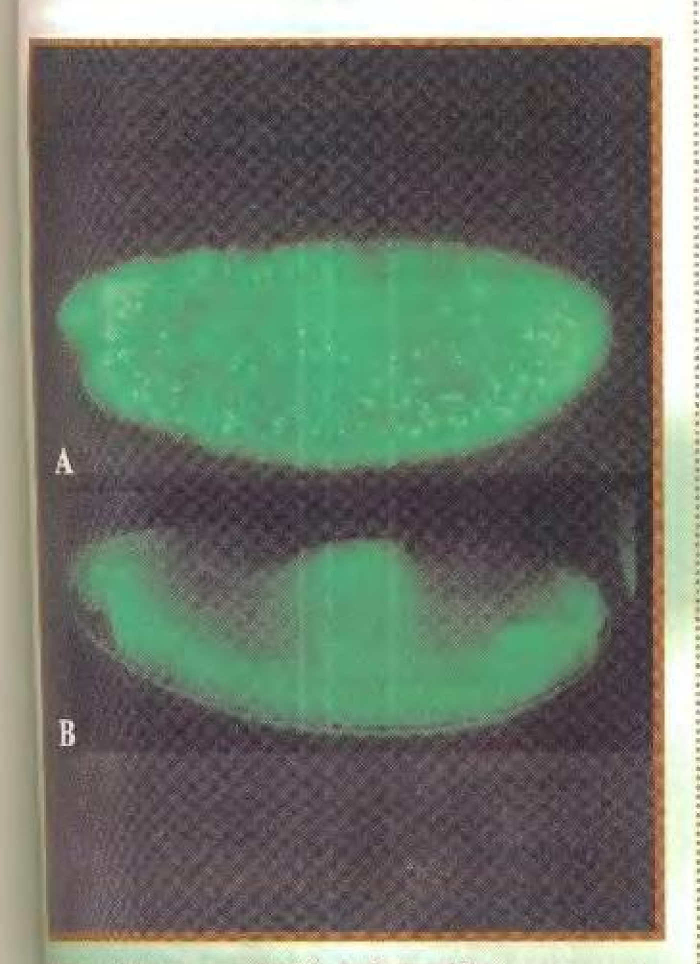
b. ¿En qué sitio de la célula cree que está localizado el DNA mutante responsable de este fenotipo?

32. El siguiente pedigrí muestra la reaparición en una familia de una enfermedad neurológica rara (símbolos negros grandes) y del aborto fetal espontáneo (símbolos negros pequeños). (Las líneas oblicuas indican que el individuo ha fallecido). Proporcione una explicación para este pedigrí en relación a la segregación citoplásmica de las mitocondrias defectuosas.



22

EL CÁNCER COMO ENFERMEDAD GENÉTICA



Muerte celular en un embrión de *Drosophila*.
A) Embrión silvestre en el que las células que han entrado en un programa genético de muerte celular (apoptosis) aparecen como puntos brillantes.
B) Embrión mutante en el que este programa genético no se está realizando. *(Kristin White, Massachusetts General Hospital y Harvard Medical School.)*

Ideas fundamentales

La proliferación celular normal está modulada por la regulación del ciclo celular.

La apoptosis es un mecanismo normal de autodestrucción que elimina las células dañadas o potencialmente peligrosas.

Existen sistemas de señalización encargados de que la proliferación celular y la apoptosis sean dos procesos coordinados dentro de una misma población de células.

En un tumor, las células proliferan sin control y eluden los mecanismos de salvaguardia, debido a la acumulación de varias mutaciones especiales en una misma célula somática.

Muchas de las categorías de genes cuya mutación induce el desarrollo de tumores son componentes importantes de la célula que directa o indirectamente participan en el control del crecimiento y de la diferenciación.

En el Capítulo 11 analizamos algunos de los mecanismos que las células utilizan para evaluar su estado en relación con el entorno y responder adecuadamente. Por ejemplo, una célula de *E. coli* puede decidir qué ruta metabólica de utilización de azúcares debe poner en marcha en cada momento, utilizando determinados metabolitos como efectores alostéricos de proteínas reguladoras de la transcripción. Los metazoos (animales con múltiples tejidos) utilizan esteroides y otras hormonas de bajo peso molecular como efectores alostéricos de reguladores de la transcripción para coordinar las respuestas de los diferentes órganos ante una situación fisiológica determinada.

La idea fundamental que debemos recordar es que las células han desarrollado mecanismos para modular la actividad de proteínas clave mediante la formación de complejos con efectores alostéricos. Gran parte de la Genética, en realidad de toda la Biología celular, depende de este tipo de modulaciones, gracias a las cuales estas proteínas clave pueden alternar entre estados activos e inactivos.

En este capítulo y en el siguiente, veremos que esta estrategia se aplica a una diversidad de situaciones: al control de la proliferación celular, al de las distintas rutas de desarrollo y a la formación de patrones biológicos complejos. En este capítulo nos centraremos en la regulación de la proliferación celular y en cómo el sistema puede verse desbordado por la aparición de cierto tipo de mutaciones que conducen a una proliferación descontrolada, es decir, a esas enfermedades que conocemos como cáncer.

Una visión general sobre el cáncer y el control del número de células

Actualmente, no cabe duda de que el cáncer es una enfermedad genética que afecta a las células somáticas. Los mecanismos de salvaguardia encargados de mantener el número de células en equilibrio con las necesidades del organismo completo fallan en las células tumorales, y éstas proliferan sin control. Para entender cómo una célula normal se transforma en célula cancerosa, es preciso comprender cuáles son los mecanismos básicos que controlan el número de células en los tejidos sanos.

La maquinaria de proliferación celular

Determinados aspectos del control de la proliferación celular son comunes a todos los organismos. De modo universal, el proceso de división celular consta de numerosos pasos que deben producirse secuencialmente para dar lugar a células hijas viables. Además, el ciclo de división celular ha evolucionado de modo que se han establecido puntos de control que aseguran que el ciclo no avanzará a menos que se hayan completado con éxito los pasos previos. Por ejemplo, sería letal que la mitosis ocurriera antes de que se completara la replicación del DNA, y por ello ha sido necesario desarrollar mecanismos que prevengan este tipo de desastres celulares. ¿Cómo se regula el ciclo celular en los eucariotas? La actividad de las proteínas clave en la progresión del ciclo celular se modula mediante la acción de dos tipos de enzimas: las quinasas, que fosforilan específicamente determinados residuos de sus proteínas diana, y las fosfatasas, que eliminan los grupos fosfatos de residuos previamente fosforilados por las quinasas. Esta alternancia entre estados fosforilados-desfosforilados es la que finalmente determina qué proteínas clave están activas en un momento determinado del ciclo celular. Dicho de otro modo, son las variaciones cíclicas en la actividad de dichas proteínas clave las que determinan qué parte del ciclo celular se ejecuta en cada momento.

La maquinaria de muerte celular

Algunos aspectos del control celular han evolucionado sólo en los organismos pluricelulares. Estos organismos necesitan mantener un equilibrio adecuado del número de células de sus diferentes tejidos para desarrollarse y funcionar normalmente. Casi todos los tejidos están compuestos de células somáticas, es decir, no contribuyen a la línea germinal. La pérdida de células somáticas no constituye un problema para el organismo desde el punto de vista de la propagación de la especie, siempre y cuando sea compensada por la proliferación de otras células del mismo tipo que reemplacen a las eliminadas. Por otro lado, la presencia de células anormales o defectuosas puede ocasionar efectos muy perjudiciales. La necesidad de eliminar de un modo controlado determinadas células ha dado lugar al desarrollo de mecanismos que constituyen el proceso denominado apoptosis o muerte celular programada. Unas enzimas conocidas como caspasas actúan en forma de cascada para destruir toda una serie de sistemas estructurales y funcionales de la célula, y provocar así su muerte. Una vez que las células están muertas, sus restos son eliminados por los macrófagos.

La coordinación de la proliferación y la muerte celular en respuesta al entorno

Las maquinarias de proliferación y muerte celular deben coordinarse de modo que cada una se active sólo cuando las condiciones de su entorno sean las adecuadas. Por ejemplo, en un órgano adulto, el mantenimiento del número adecuado de células requiere que exista un equilibrio entre el nacimiento de las nuevas células y la desaparición de las ya existentes. Las células eucarióticas han desarrollado sistemas complejos de señalización intercelular que les permiten evaluar las condiciones de su entorno. Determinadas señales estimulan la proliferación celular, mientras que otras la inhiben. Otras señales pueden activar los procesos de apoptosis, mientras que otras los bloquean. Los componentes típicos de los sistemas de señalización intercelular son: las propias señales, los receptores de dichas señales y los sistemas de transducción de señales encargados de transmitir la información a las diferentes regiones de la célula. Del mismo modo que los efectores alostéricos modulan la actividad de muchas proteínas bacterianas de unión a DNA, la actividad de los sistemas de señalización intercelular se modula mediante la modificación de sus componentes: la fosforilación de proteínas, las interacciones alostéricas entre proteínas y moléculas pequeñas, o la interacción entre distintas subunidades proteicas.

La maquinaria de proliferación celular

El ciclo celular

El ciclo celular se compone de cuatro etapas principales: la fase M o mitosis, y otras tres que, en su conjunto, constituyen la denominada interfase, G1, S y G2. La fase G1 comprende el período entre el final de la mitosis y el inicio de la replicación del DNA; durante la fase S tiene lugar la síntesis del DNA, y la fase G2 es el período que sigue a la replicación del DNA y precede a la iniciación de la profase mitótica. En los mamíferos, cuyo ciclo celular ha sido particularmente bien caracterizado, se ha observado que las diferencias en las tasas de división celular se deben principalmente a diferencias en el tiempo que transcurre entre que las células entran y salen de la fase G1. Esta variación se debe a la existencia de una fase de reposo opcional denominada G0, a la cual pueden acceder las células que están en la fase G1 y permanecer durante un tiempo variable, cuya duración depende del tipo celular y de las condiciones de su entorno. Por el contrario, las fases S, G2 y M suelen tener una duración fija. En esta sección, vamos a ocuparnos de qué moléculas gobiernan la progresión del ciclo celular. En una sección posterior, analizaremos cómo estas moléculas se integran en el funcionamiento global de la célula.

Ciclinas y quinasas de proteínas dependientes de ciclinas

Los «motores» que impulsan la progresión del ciclo celular son una serie de complejos proteicos compuestos de dos subunidades: una **ciclina** y una **quinasa de proteínas dependiente de ciclina** (abreviada como **CDK**, del inglés *Cyclin-Dependent protein Kinase*). En todos los eucariotas, podemos encontrar una familia de ciclinas estructural y funcionalmente relacionadas. Las ciclinas reciben este nombre porque cada una de ellas sólo está presente durante un segmento del ciclo celular. La aparición de una ciclina determinada está regulada transcripcionalmente por el propio ciclo: un complejo ciclina-CDK funcional preexistente dirige la activación de un factor transcripcional que, a su vez, activa la transcripción de esta nueva ciclina. La desaparición de una ciclina depende de tres sucesos: la rápida inactivación del activador de la transcripción de dicha ciclina (de modo que no se sintetice más mRNA), el alto grado de inestabilidad del mRNA de la ciclina (que implica que el mRNA ya sintetizado sea eliminado) y el alto grado de inestabilidad de la propia ciclina (de modo que la proteína se degrade).

Las quinasas de proteína dependientes de ciclina también constituyen una familia de proteínas estructural y funcionalmente relacionadas. Las **quinasas** son enzimas que añaden grupos fosfato a sus sustratos; en el caso de las quinasas de proteínas, entre las que se incluyen las CDK, los sustratos son proteicos. Las CDK reciben este nombre debido a que su actividad está regulada por ciclinas y a que catalizan la fosforilación de determinados residuos de serina y treonina de las proteínas diana.

El factor que determina qué proteínas diana son fosforiladas por cada CDK es la ciclina asociada. La ciclina se une a la proteína diana, fijándola para que la quinasa pueda fosforilarla (Fig. 22-1), y así modificar la actividad de la proteína diana.

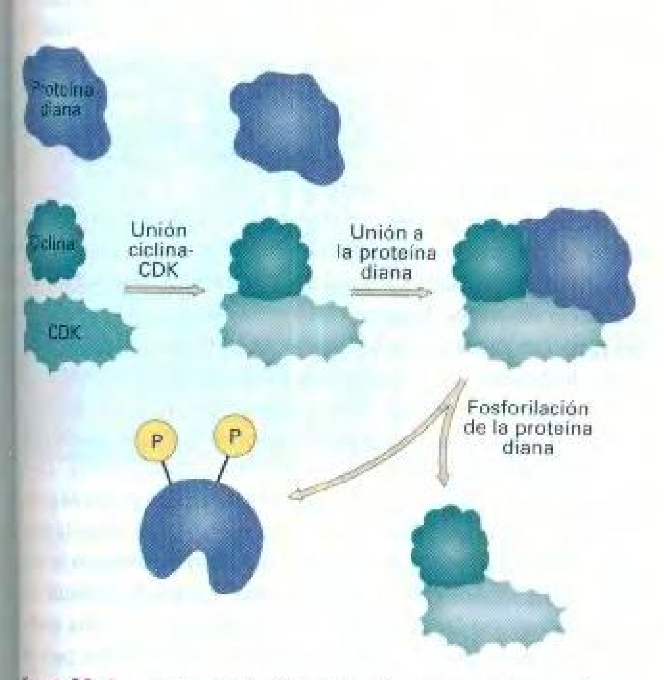


Figura 22-1. Pasos en la fosforilación de las proteínas diana por el complejo ciclina-CDK. Primero, se produce la unión de una ciclina y de una CDK para formar un complejo ciclina-CDK activo. Entonces, la proteína diana se une al complejo por la parte de la ciclina, y así se colocan los sitios de fosforilación próximos al centro activo de la CDK. Una vez que la proteína diana es fosforilada, pierde la capacidad de unión a la ciclina y se libera del complejo.

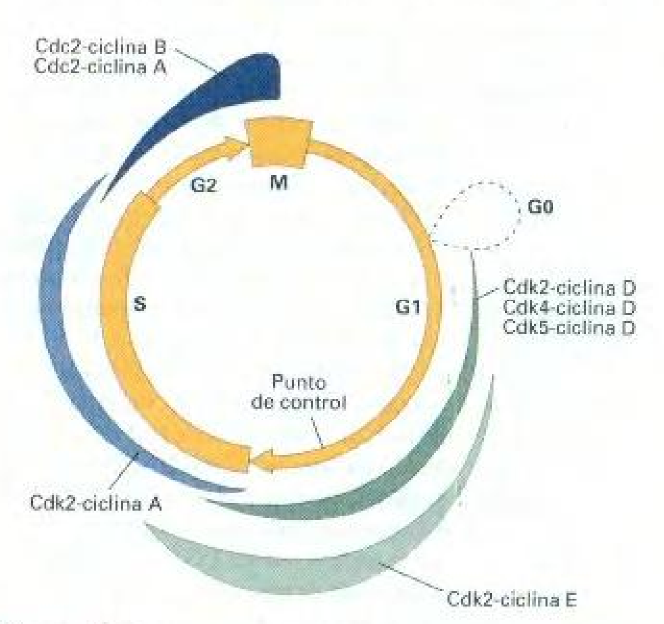


Figura 22-2. Una visión actual de las variaciones en las actividades de los complejos ciclina-CDK a lo largo del ciclo celular de una célula de mamífero. La anchura de las bandas refleja las actividades relativas de los diferentes complejos ciclina-CDK. Observe que varias ciclinas diferentes (A, B, C y E) pueden unirse a varias CDK diferentes (Cdc2, Cdk2, Cdk4 y Cdk5) para formar complejos distintos, aumentando así el número de combinaciones ciclina-CDK que pueden formarse durante la progresión del ciclo celular. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)

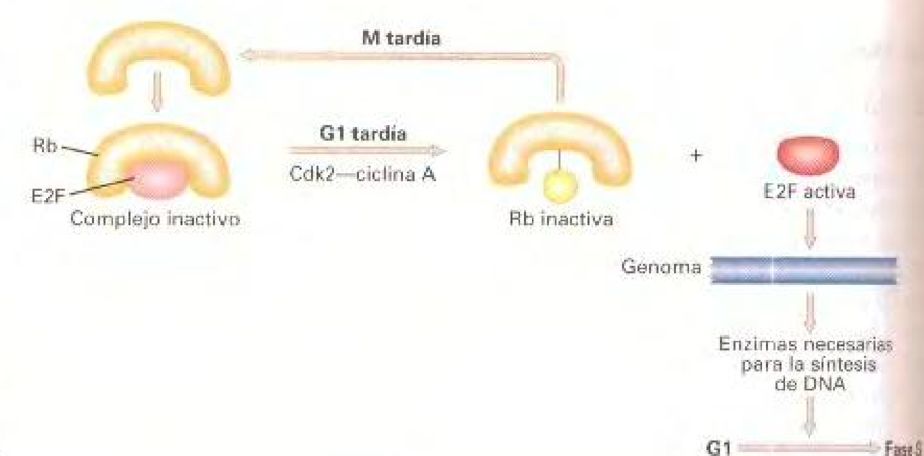


Figura 22-3. Participación de las proteínas Rb y E2F en la regulación de la transición entre la fase G1 y la fase S en una célula de mamífero. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)

Puesto que las ciclinas presentes en cada fase del ciclo celular son diferentes (Fig. 22-2), cada una de estas fases se caracteriza por la fosforilación de un conjunto específico de proteínas diana. La fosforilación es una modificación transitoria y reversible. Cuando el complejo CDK-ciclina desaparece, las proteínas fosforiladas son rápidamente desfosforiladas por la acción de las fosfatasas.

Proteínas diana de las CDK

¿Cómo se controla el ciclo celular mediante la fosforilación de algunas proteínas diana? La fosforilación inicia una serie de sucesos que culmina con la activación de factores de transcripción concretos. Estos factores de transcripción promueven la expresión de determinados genes cuyos productos son necesarios en la siguiente fase del ciclo celular. Gran parte de lo que conocemos sobre el ciclo celular proviene de estudios genéticos realizados con levaduras (véase la sección siguiente) y de estudios bioquímicos realizados con cultivos de células de mamífero. Un ejemplo bien caracterizado en mamíferos es la ruta del Rb-E2F. Rb es la proteína diana de un complejo CDK-ciclina denominado Cdk2-ciclina A y E2F es el factor de transcripción regulado por Rb (Fig. 22-3). Desde la fase M tardía hasta la mitad de la fase G1, las proteínas Rb y E2F constituyen un complejo inactivo, y por tanto incapaz de promover la transcripción. En la fase G1 tardía, aparece el complejo Cdk2-ciclina A, que fosforila la proteína Rb. Esta fosforilación produce un cambio conformacional que provoca su disociación del factor E2F. La proteína E2F libre activa entonces la transcripción de un grupo de genes que cifran enzimas esenciales para la replicación del DNA. Las células se encuentran ahora en disposición de proceder a la siguiente fase —la fase S— del ciclo celular.

Rb y E2F, de hecho, son miembros representativos de dos familias de proteínas relacionadas. En los mamíferos, se cree que los diferentes complejos CDK-ciclina (Fig. 22-2) fosforilan selectivamente diferentes proteínas de la familia Rb, cada una de las cuales a su vez libera la proteína específica de la familia E2F a la que está unida. Los diferentes factores E2F activan entonces la transcripción de distintos genes encargados de ejecutar diferentes aspectos del ciclo celular.

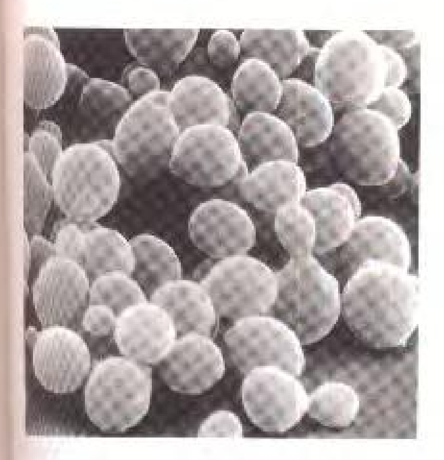
COROLARIO

La progresión del ciclo celular está controlada en última instancia por la activación secuencial de los diferentes complejos CDK-ciclina.

La levadura: organismo modelo para el estudio del ciclo celular

El progreso en el análisis genético del ciclo celular se ha basa
fundamentalmente en estudios realizados en dos especies de le
vadura: *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 22-4) y *Schizosacch*
romyces pombe (Fig. 22-5). En cada una de estas especies, e
análisis genético del ciclo celular ha puesto de manifiesto
existencia de un amplio conjunto de funciones necesarias para
desarrollo correcto del ciclo celular. Estas funciones han podi
identificarse mediante el aislamiento de una clase particular
mutaciones termosensibles (*ts*) denominadas mutaciones c
(del inglés *Cell Division Cycle*).

Las células de levadura portadoras de estas mutaciones c
crecen de un modo normal a temperaturas bajas. Si se pasa
temperaturas restrictivas, más altas, estas levaduras mutan
cdc dejan de crecer. Lo novedoso de las mutaciones *cdc* den
del conjunto general de las mutaciones *ts*, es que un mutante
concreto detiene su crecimiento en un momento determinado
ciclo celular, de modo que todas las células presentan el mi
aspecto. Consideremos algunos ejemplos de *S. cerevisiae*, u
levadura que normalmente se divide por gemación (Fig. 22-
un proceso por el que la célula madre genera una pequeña pr
berancia o «yema». Mientras la yema crece, tiene lugar la mi
sis, de manera que uno de los polos del huso acromático se si
en la célula madre y el otro en la yema. La yema continúa c
ciendo hasta que alcanza el mismo tamaño que la célula ma
momento en el que se produce la separación de ambas para
lugar a dos células hijas. Un mutante *ts* cualquiera de *S. cere*
siae, cuando se transfiere a temperaturas restrictivas, puede
tener su crecimiento en cualquier momento del ciclo de form
ción de la yema o de la división celular. Por el contrario, cua
un mutante *cdc* de *S. cerevisiae* se pasa a temperatura restricti
producirá únicamente células con yemas diminutas, mient



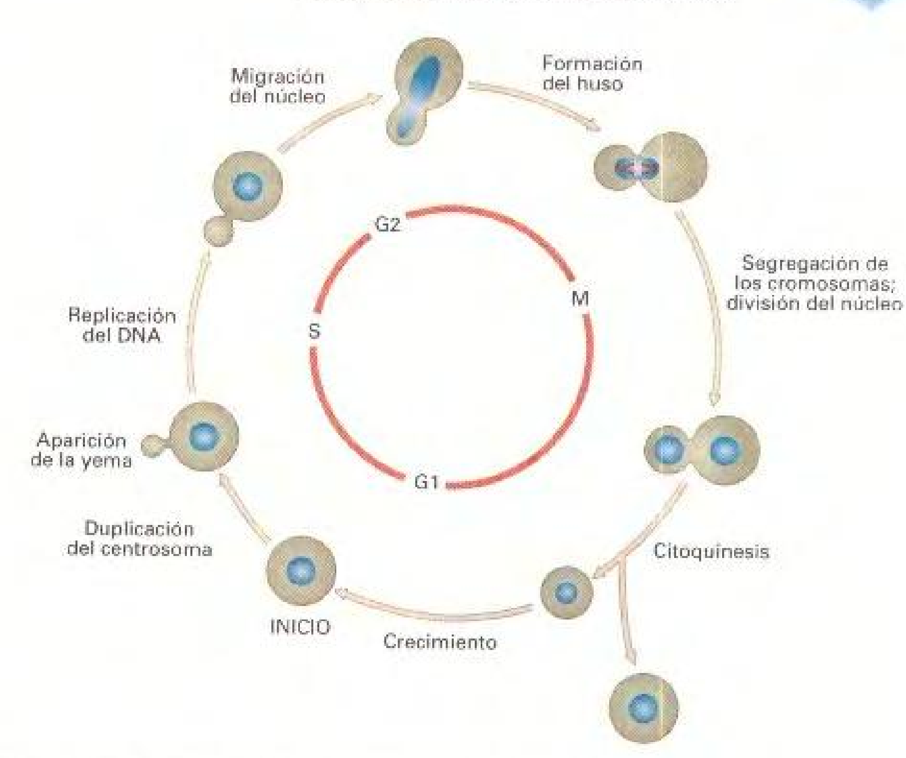
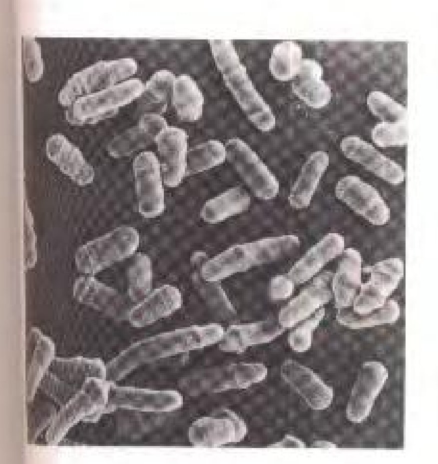


Figura 22-4. Ciclo celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La microfotografía electrónica de barrido muestra células en diferentes momentos del ciclo celular, tal como puede apreciarse por el diferente tamaño de las yemas. El esquema muestra los pasos principales del ciclo celular (Cortesía de E. Schachtbach y I. Herskowitz. De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)



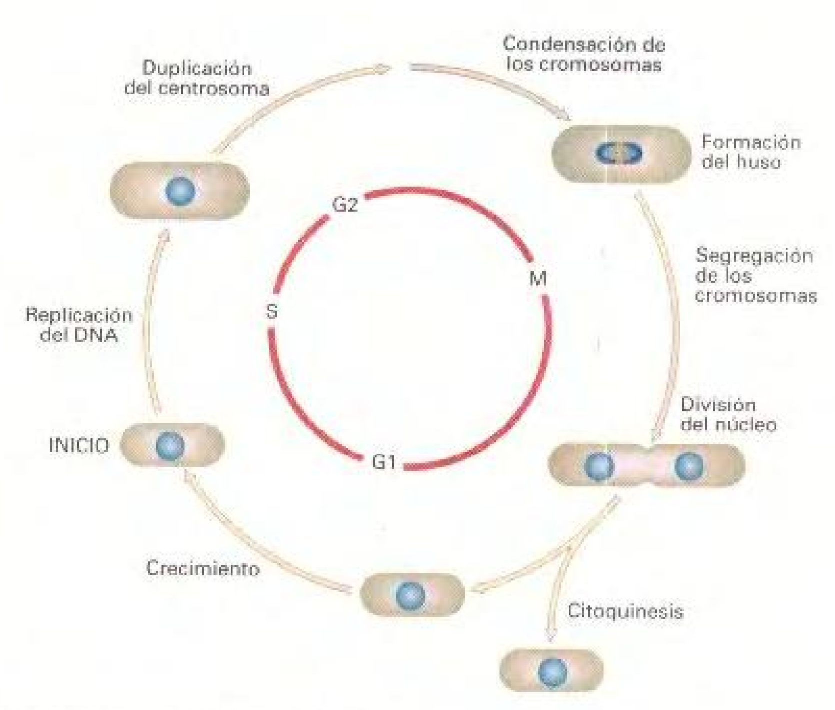


Figura 22-5. Ciclo celular de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. La microfotografía electrónica de barrido muestra células dividiéndose de forma simétrica y en diferentes momentos del ciclo celular. El diagrama muestra la progresión temporal de los diferentes pasos del ciclo celular de *S. pombe*. (Cortesía de E. Schachtbach y I. Herskowitz. De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)

que otro mutante *cdc* distinto producirá, por ejemplo, yemas grandes con la mitad del tamaño de la célula madre. Estas diferencias en los fenotipos Cdc son el reflejo de diferentes defectos en la maquinaria encargada de ejecutar pasos específicos necesarios para la progresión del ciclo celular. De manera similar, la levadura de fisión *S. pombe*, que se divide de forma simétrica mediante un mecanismo más habitual (la fisión), para dar lugar a dos células hijas equivalentes, ha sido utilizada también para generar mutantes *cdc* y caracterizar el ciclo celular. Curiosamente, los genes *cdc* identificados por estos experimentos en estas dos levaduras tan diferentes cifran las mismas proteínas. Dicho de otra manera, la maquinaria del ciclo celular en estas dos especies es esencialmente idéntica.

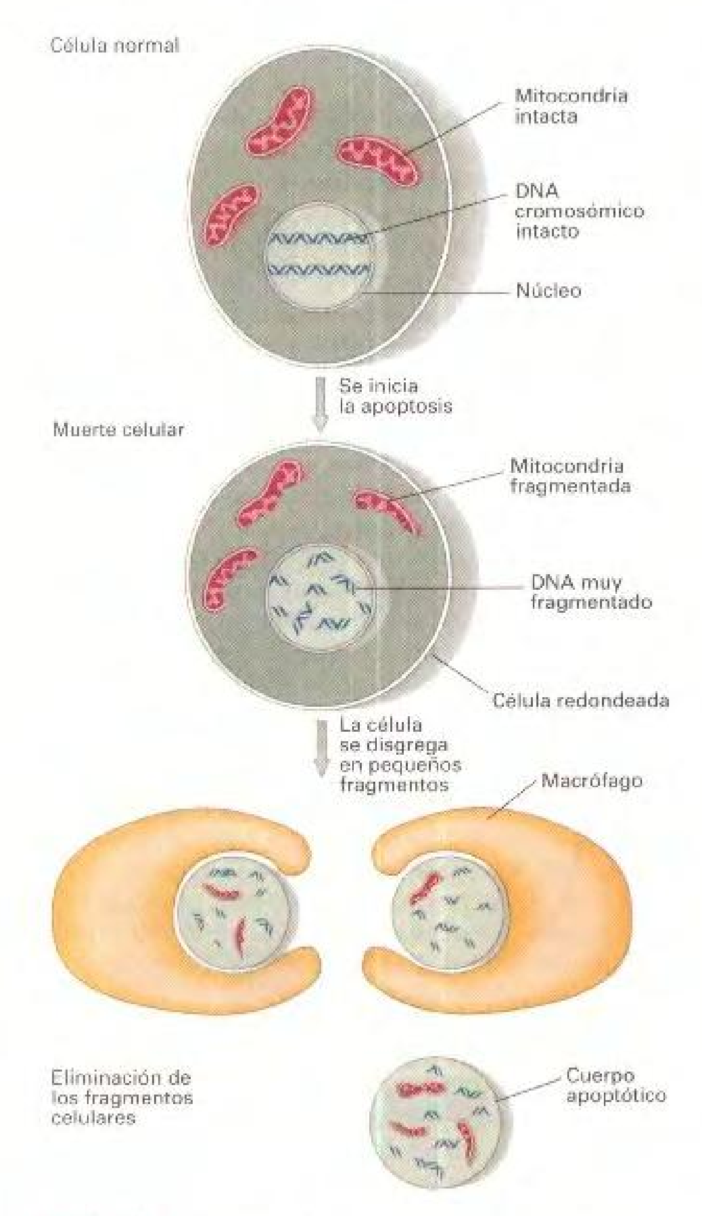


Figura 22-6. Secuencia de cambios fenotípicos durante la apoptosis. Primero, se destruyen las membranas de orgánulos como las mitocondrias y su contenido se vierte al citoplasma, se fragmenta el DNA cromosómico en pequeños trozos y la célula pierde su forma normal. Entonces, la célula se disgrega en pequeños fragmentos que son eliminados por los macrófagos.

La finalización del proyecto de secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* (Cap. 14), ha permitido identificar el conjunto completo de proteínas de las familias de ciclinas y de CDK (22 y 5, respectivamente). En la actualidad, estos genes están siendo mutagenizados sistemáticamente y caracterizados genéticamente para entender cuál es su función concreta en el ciclo celular.

La maquinaria implicada en la muerte celular programada

La ruta de apoptosis

Los organismos multicelulares han desarrollado sistemas para eliminar células dañadas (y por lo tanto, potencialmente peligrosas) mediante un mecanismo de autodestrucción denominado **muerte celular programada** o **apoptosis**. Este mecanismo de autodestrucción se activa ante circunstancias diversas, pero el proceso de apoptosis discurre siempre del mismo modo (Fig. 22-6). En primer lugar, se produce la fragmentación del DNA cromosómico, la desorganización estructural de los orgánulos y la pérdida de la morfología normal de la célula (las células apoptóticas se vuelven esféricas). Después, las células se descomponen en pequeños fragmentos denominados cuerpos apoptóticos que son fagocitados (literalmente engullidos) por los macrófagos.



Figura 22-7. Papel de las caspasas ejecutoras en la apoptosis. Una cascada de activación de caspasas conduce a la activación de las caspasas ejecutoras. Una caspasa corta la forma zimógeno (precursor inactivo) de la caspasa ejecutora en varios residuos de aspartato, dando lugar a varios fragmentos proteicos. Dos de estos fragmentos, las subunidades grande y pequeña, se unen para formar la caspasa enzimáticamente activa. Mediante la digestión de una serie de proteínas diana (también cortando en residuos de aspartato), se promueven los diferentes pasos que conducen finalmente a la muerte y eliminación de la célula.

En esta sección, estudiaremos las moléculas implicadas en el proceso de apoptosis. En una sección posterior, consideraremos cómo se regula el proceso dentro de la célula.

Caspasas

Los «motores» de la autodestrucción son una serie de enzimas denominadas **caspasas** (del inglés *cystein-containing aspartate-specific proteases*), que presentan actividad proteasa, es decir, son enzimas que digieren otras proteínas. Las caspasas son proteínas ricas en cisteína que, cuando se activan, cortan en determinados residuos de aspartato de las proteínas diana. En cada organismo encontramos una familia de caspasas relacionadas entre sí por la similitud de sus secuencias polipeptídicas: en la especie humana, por ejemplo, se han identificado hasta el momento 10 caspasas. En las células normales, las caspasas se encuentran en un estado enzimáticamente inactivo denominado **zimógeno**. En términos generales, un zimógeno es la forma precursora inactiva de la enzima, de tamaño superior al de la forma activa final. Para convertir el zimógeno en una caspasa activa, debe eliminarse una parte del polipéptido mediante digestión enzimática (proteólisis).

Actualmente, se piensa que existen dos tipos de caspasas: *iniciadoras* y *ejecutoras*, aunque todavía no se conoce con exactitud cómo se organizan estas actividades para producir la cascada proteolítica. Una posibilidad es que las caspasas iniciadoras sean activadas por proteólisis en respuesta a las señales activadoras procedentes de otras clases de proteínas. Una vez activadas, las caspasas iniciadoras digerirían caspasas ejecutoras que, a su vez, actuarían sobre otras proteínas, y así sucesivamente.

COROLARIO

La muerte celular programada está mediada por una cascada secuencial de proteólisis que activa enzimas destinadas a destruir varios componentes celulares clave.

¿Cómo llevan a cabo la sentencia de muerte celular las caspasas ejecutoras? Además de activar otras caspasas, las caspasas ejecutoras cortan enzimáticamente sus proteínas dianas (Fig. 22-7). Una de las dianas es una proteína «secuestradora» que forma un complejo con una endonucleasa de DNA, de modo que la retiene (la secuestra) en el citoplasma. Cuando la caspasa digiere la proteína secuestradora, la endonucleasa queda libre para entrar en el núcleo y trocear el DNA de la célula. Otra de las dianas es una proteína que, tras la acción de la caspasa, digiere la actina, uno de los componentes principales del citoesqueleto, lo que provoca la desorganización de los filamentos de actina y la pérdida de la morfología celular. De modo similar, se cree que todos los demás aspectos del fenotipo apoptótico están mediados por la acción de proteasas activadas por las caspasas.

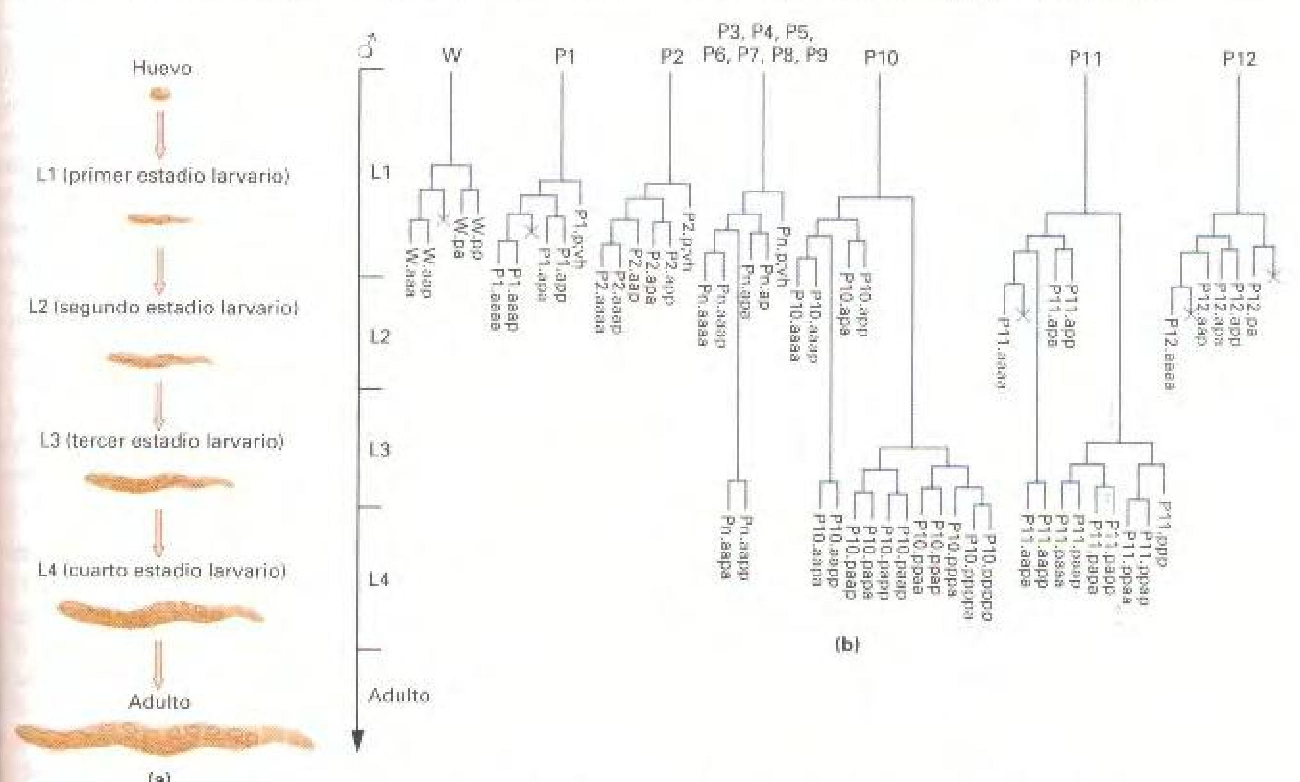


Figura 22-8. Ejemplos de muerte celular programada durante el desarrollo de *C. elegans* (a) Ciclo de vida del nemátodo. (b) Representación simbólica de los linajes celulares de 13 células (la célula W, la célula P1, etc.) generados durante la embriogénesis. El eje vertical representa el tiempo de desarrollo, empezando desde la eclosión del huevo, que inicia el primer estadio larvario (L1). En cada linaje, una línea vertical azul conecta las diferentes divisiones celulares (líneas horizontales azules). Se indican los nombres de las células finalmente resultantes, como, por ejemplo, W.aaa o P1.apa. En varios casos, la división celular da lugar a una célula viable y otra que sufre apoptosis. Las células que entran en el programa de muerte celular están representadas con una X azul al final de la rama correspondiente. En individuos homocigóticos para mutaciones como la *ced-3*, estas muertes celulares no se producen.

El nematodo *Caenorhabditis elegans*: un organismo modelo para el estudio de la muerte celular programada

Aunque la muerte celular programada se ha descrito en distintos organismos, han sido los estudios realizados en los últimos 10 años con el nematodo *Caenorhabditis elegans* los que realmente han propulsado un avance considerable en este campo. Se ha conseguido determinar las series completas de divisiones celulares que dan lugar a las aproximadamente 1000 células somáticas del gusano adulto, resultando de especial interés lo que se observa en alguna de las divisiones de las células embrionarias y larvarias, en particular las que participan en el desarrollo del sistema nervioso: la célula madre da lugar a dos células hijas y una de ellas, a continuación, entra en el proceso de muerte celular programada (Fig. 22-8). Estas divisiones, en las que la célula madre produce una única célula hija viable, son necesarias para que ésta desempeñe adecuadamente su función durante el desarrollo.

Se ha identificado un conjunto de mutaciones que bloquean este fenotipo de muerte celular en el gusano. Algunas de estas mutaciones afectan a la función de genes que cifran caspasas. Un ejemplo de este tipo es la mutación *ced-3* (del inglés *CEll Death gene number 3*), implicando claramente a las caspasas en el proceso de apoptosis. El análisis que se está llevando a cabo de otros mutantes afectados en el proceso de muerte celular programada, tanto en el gusano como en otros sistemas experimentales, está poniendo de manifiesto que existen otros elementos clave en este proceso. Algunos de ellos han sido identificados entre los genes supresores de tumores que habían sido previamente aislados en estudios sobre la formación y el desarrollo de tumores (y que discutiremos en la segunda parte de este capítulo).

La regulación de las maquinarias de proliferación y muerte celular

Hemos utilizado el término *motor* para describir el papel de los complejos ciclina-CDK y de las cascadas de caspasas en la proliferación celular y la muerte celular programada, respectivamente. Por seguir con esta analogía, los interruptores de encendido y los aceleradores (controles positivos) ponen en marcha los motores e impulsan el movimiento de estos procesos, y los frenos (controles negativos) reducen la velocidad o detienen los procesos cuando es necesario. Como el ciclo celular y la apoptosis, los controles positivos y negativos se basan en la modulación de las actividades proteicas mediante el establecimiento de interacciones proteína-proteína y de la modificación de dichas proteínas.

Señales intracelulares

Algunos de los elementos de los circuitos de regulación positiva y negativa son señales que se originan dentro de la célula.

El ciclo celular: controles intracelulares negativos. Mediante la activación de proteínas que pueden inhibir la actividad quinasa de los complejos ciclina-CDK, se puede detener la progresión del ciclo celular hasta que los distintos mecanismos de control den «luz verde», indicando que la célula está preparada para pasar a la siguiente fase del ciclo.

Un ejemplo de cómo operan estos mecanismos de control tiene como punto de partida la presencia de daños en el DNA (Fig. 22-9). Cuando se producen daños en el DNA durante la fase G1 (por ejemplo, por irradiación con rayos X), se inhibe la actividad CDK de los complejos CDK-ciclina. Esta inhibición parece estar mediada por una proteína denominada p53. Una parte de la proteína p53 reconoce cierto tipo de emparejamientos erróneos en el DNA. Ante la presencia de éstos, p53 activa otra

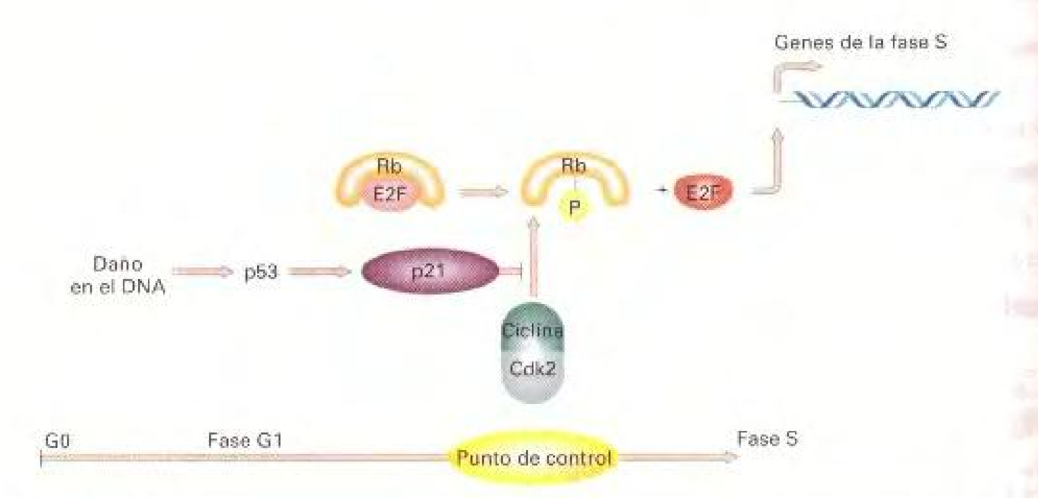


Figura 22-9. Ejemplo de control que inhibe la progresión del ciclo celular. En los mamíferos, la transición desde la fase G1 a la fase S requiere que el complejo CDK2-ciclina fosforile la proteína Rb. En presencia de DNA dañado, se induce la proteína p53, que a su vez induce a la proteína p21. Cuando los niveles de p21 son elevados, se inhibe la actividad quinasa del complejo CDK2-ciclina. Una vez que el DNA se ha reparado, los niveles de p53 bajan y, consecuentemente, también se reducen los niveles de p21. Así, desaparece la inhibición de la actividad quinasa del complejo CDK2-ciclina, lo que permite que Rb sea fosforilado, el factor de transcripción E2F se active y, de este modo, la célula progrese hasta la fase S. (Adaptado de C. J. Sherr y J. M. Roberts, *Genes and Development* 9, 1995, 1150.)

proteína, p21. Cuando los niveles de p21 son altos, ésta se une al complejo CDK-ciclina e inhibe su actividad quinasa. Sin esta actividad quinasa, las proteínas diana de la CDK no son fosforiladas y el ciclo celular no puede progresar. Cuando los daños en el DNA han sido reparados, el proceso de inhibición revierte mediante una caída de los niveles de p53 tras la reparación del DNA y el cese de la inhibición de la actividad quinasa del complejo CDK-ciclina, lo que se traduce en el desbloqueo del punto de control G1-S.

De esta manera, los mecanismos de control evalúan el estado de la reparación del DNA, del aparato mitótico y de otros componentes importantes del ciclo celular, y operan como sistemas de frenado si es necesario. La clave está en la existencia de proteínas reguladoras que pueden modular la actividad quinasa de los complejos CDK-ciclina.

COROLARIO

Los mecanismos de control o salvaguardia aseguran que el ciclo celular no progrese hasta que la célula esté preparada.

El ciclo celular: controles intracelulares positivos. Para que el ciclo celular avance, no sólo hace falta soltar el «freno», sino también poner en marcha el sistema de «transmisión» y el «motor». Una vez que se suelta el freno, señales independientes que proceden tanto del exterior como del interior celular inducen una cascada de quinasas que fosforilan el complejo CDK-quinasa correspondiente, activando de ese modo dicho complejo. A su vez, esta activación permite que el complejo fosforile sus propias proteínas diana.

Apoptosis: controles intracelulares positivos. Se sabe ya desde hace bastantes años que muchas formas de daño celular provocan que las mitocondrias liberen parte de sus componentes al citoplasma, y que esta pérdida de material de algún modo induce la respuesta apoptótica. De hecho, parece ser que uno de los interruptores de encendido es el citocromo *c*, una de las proteínas mitocondriales que participan en la respiración celular. La detección del citocromo *c* en el citoplasma induce la activación de las caspasas iniciadoras. Se cree que esta detección ocurre al unirse el citocromo *c* a otra proteína denominada Apaf (del inglés *Apoptotic Protease-Activating Factor*). Una vez formado, el complejo citocromo *c*-Apaf se une a la caspasa iniciadora y la activa.

Apoptosis: controles intracelulares negativos. Probablemente la irreversibilidad de la muerte celular ha sido el factor determinante para el desarrollo de sistemas alternativos que aseguren que el proceso apoptótico no se pone en marcha en condiciones normales. Proteínas como las Bcl-2 y Bcl-x de mamíferos cumplen esta función. Uno de los posibles modos de acción de las proteínas Bcl podría ser que impidieran la liberación del citocromo *c* de la mitocondria (tal vez al reforzar la estructura mitocondrial), o que se unieran a la proteína Apaf para evitar su interacción con la caspasa iniciadora.

Señales extracelulares

Las células de un organismo pluricelular evalúan constantemente su propio estado interno en relación con su capacidad de proliferación y supervivencia. No obstante, la proliferación y supervivencia de una célula debe supeditarse a las necesidades de la población a la que pertenece (entendiendo por población todo el embrión temprano, un tejido, o una parte del cuerpo como un miembro o un órgano). Por ejemplo, en muchos órganos adultos, las células madre se dividen para producir más células sólo cuando ocurre una disminución del número celular. Sin la existencia de estos mecanismos de homeostasis, los órganos no mantendrían el tamaño proporcional adecuado.



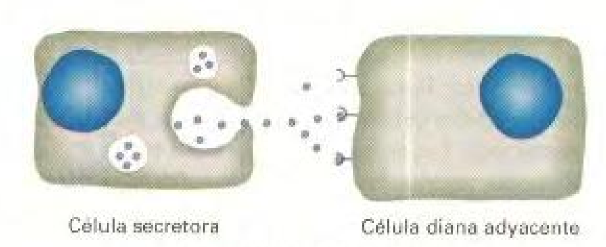


Figura 22-10. Mecanismos de señalización intercelular. (a) Las señales endocrinas pasan al sistema circulatorio y pueden ser percibidas por células diana distantes. (b) Las señales paracrinas actúan localmente y son recibidas por células diana vecinas. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)

Mecanismos de comunicación intercelular. La coordinación de prácticamente todos los aspectos del desarrollo y la fisiología en los organismos pluricelulares complejos requiere que se transmitan muchos tipos de señales entre las células. A continuación, se describen brevemente las principales rutas de comunicación intercelular.

Todos los sistemas de comunicación intercelular tienen varios componentes. Uno de los componentes, el **ligando**, es secretado por las células que emiten la señal (Fig. 22-10). Algunos ligandos, denominados hormonas, son **señales endocrinas** de largo alcance que se transmiten a lo largo de todo el cuerpo tras ser liberadas al sistema circulatorio por los órganos endocrinos que las producen. (En el Cap. 11 se discutieron las hormonas esteroides y sus receptores). Las hormonas pueden actuar simultáneamente sobre muchos tejidos diferentes, que pueden así responder de una forma coordinada. Otros ligandos secretados actúan como **señales paracrinas**; es decir, no pasan al torrente circulatorio, sino que actúan localmente y, en algunos casos, sólo sobre las células inmediatamente adyacentes. En el Capítulo 23 volveremos a tratar las señales paracrinas y endocrinas. Algunos li-

gandos son proteínas, mientras que otros son moléculas pequeñas como los esteroides o la vitamina D. La mayoría (aunque no todas) de las señales endocrinas son moléculas pequeñas, tales como las hormonas esteroides de mamíferos, que son responsables del desarrollo de los fenotipos específicos del sexo masculino (andrógenos) y del sexo femenino (estrógenos). Por el contrario, la mayoría de las señales paracrinas son proteínas. En este Capítulo centraremos nuestra atención en la comunicación paracrina a través de ligandos proteicos.

Los ligandos proteicos actúan como señales uniéndose, y así activando, a receptores transmembrana de naturaleza proteica que se encuentran en la superficie celular, integrados en la membrana plasmática. Estos complejos ligando-receptor inician la emisión de señales químicas en el citoplasma, justo al otro lado de la membrana. Las señales se transmiten a través de una serie de moléculas intermediarias, hasta que finalmente provocan cambios estructurales en factores de transcripción del núcleo, lo que conlleva la activación transcripcional de algunos genes y la represión de otros.

Los receptores transmembrana constan de una parte que se encuentra en el exterior celular (el dominio extracelular), una parte central que atraviesa una o varias veces la membrana plasmática, y otra parte en el interior de la célula (el dominio intracelular) (Fig. 22-11).

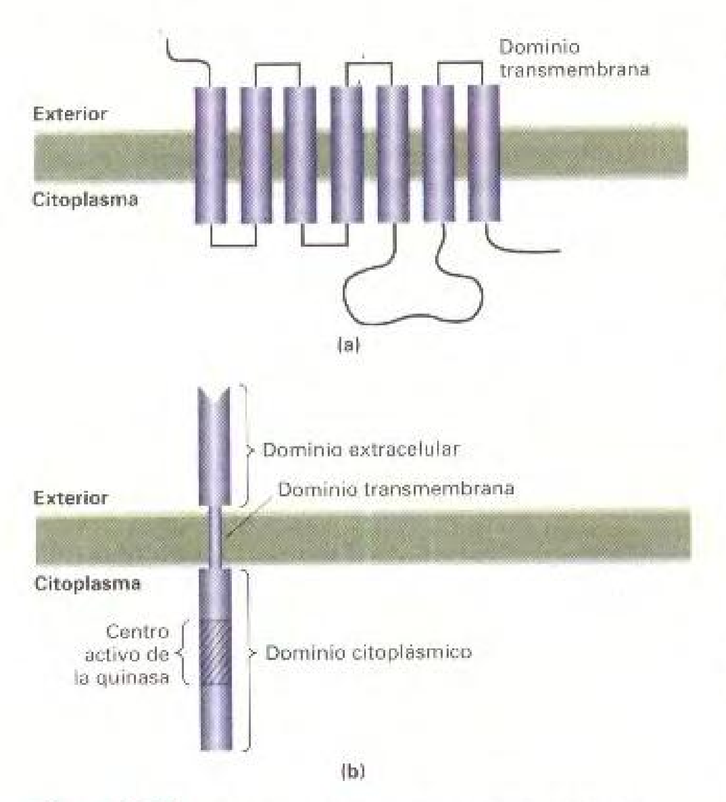


Figura 22-11. Ejemplos de receptores transmembrana. (a) Receptor que atraviesa la membrana siete veces. (b) Receptor quinasa de tirosina (RTK) con un solo dominio transmembrana. El dominio extracelular se une al ligando. El centro activo de la quinasa de tirosina está en el dominio citoplásmico. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)

El dominio extracelular del receptor es la región a la que se une el ligando. Muchos ligandos proteicos son dímeros y pueden unirse simultáneamente a dos monómeros del receptor. La unión simultánea a dos moléculas del receptor provoca el acercamiento de los dos dominios intracelulares, y así activa la función señalizadora de estos dominios. Entre los receptores de ligandos proteicos se encuentran los receptores quinasa de tirosina (RTK, del inglés *Receptor Tyrosine Kinase*. Fig. 22-11*b*). Sus dominios citoplásmicos, una vez activados, tienen la capacidad de fosforilar determinados residuos de tirosina de las proteínas diana. Otros receptores son quinasas de serina/treonina. Incluso existen otros receptores que no presentan actividad enzimática propia; cuando estos receptores se unen al ligando, se produce un cambio en su conformación, que a su vez provoca cambios conformacionales y la activación de proteínas citoplásmicas unidas al dominio intracelular del receptor.

Quizás, los receptores de ligandos proteicos mejor caracterizados son los receptores quinasa de tirosina (Fig. 22-12). RTK es un monómero que se encuentra básicamente «flotando» dentro del plano de la membrana plasmática. La unión ligando-receptor provoca la interacción de dos monómeros RTK para formar un dímero, y esta dimerización provoca que la actividad quinasa del dominio citoplásmico del RTK se active. Los primeros residuos fosforilados son varias tirosinas situadas en el dominio citoplásmico del propio RTK; este proceso se conoce como *autofosforilación*, pues la quinasa actúa sobre sí misma. La autofosforilación inicia una cascada de transducción de señales, en la que, de modo secuencial, la modificación de la conformación de una proteína induce a su vez modificaciones en la conformación de otras proteínas. Finalmente, la cascada de transducción de señales conduce a la modificación de activadores y represores de la transcripción y, por consiguiente, a cambios en la expresión de muchos genes de la célula diana.

La autofosforilación del RTK activa las cascadas de transducción de señales de dos maneras. En uno de los mecanismos, los residuos fosforilados del RTK son reconocidos específicamente por proteínas *adaptadoras* (Fig. 22-12*a*). Múltiples proteínas adaptadoras se «anclan» a los sitios fosforilados del RTK y se colocan muy próximas entre sí. Estas proteínas adaptadoras a su vez tienen afinidad por otras proteínas que son elementos de la cascadas de transducción de señales. Al unirse a las proteínas adaptadoras, dichos elementos también se acercan entre sí y así se favorece el establecimiento de interacciones proteína-proteína que conducen a la activación de otras cascadas. En el otro mecanismo, la proteína RTK fosforilada adopta una conformación diferente que provoca un cambio en su especificidad, de tal manera que ahora dirige su actividad quinasa a otras proteínas diana (Fig. 22-12b). Estas proteínas fosforiladas también sufren cambios conformacionales que les permiten participar en la activación de la cascada de transducción de señales. Mediante estos dos mecanismos, la activación de un RTK puede conducir a la activación simultánea de múltiples rutas de transducción de señales.

Con bastante frecuencia, el siguiente paso en la propagación de la señal es la activación de una proteína G. Las proteínas G alternan entre dos estados: un estado inactivo, cuando la proteína está unida a GDP, y un estado activo, cuando la proteína está unida a GTP. La propagación de la señal a partir del RTK condu-

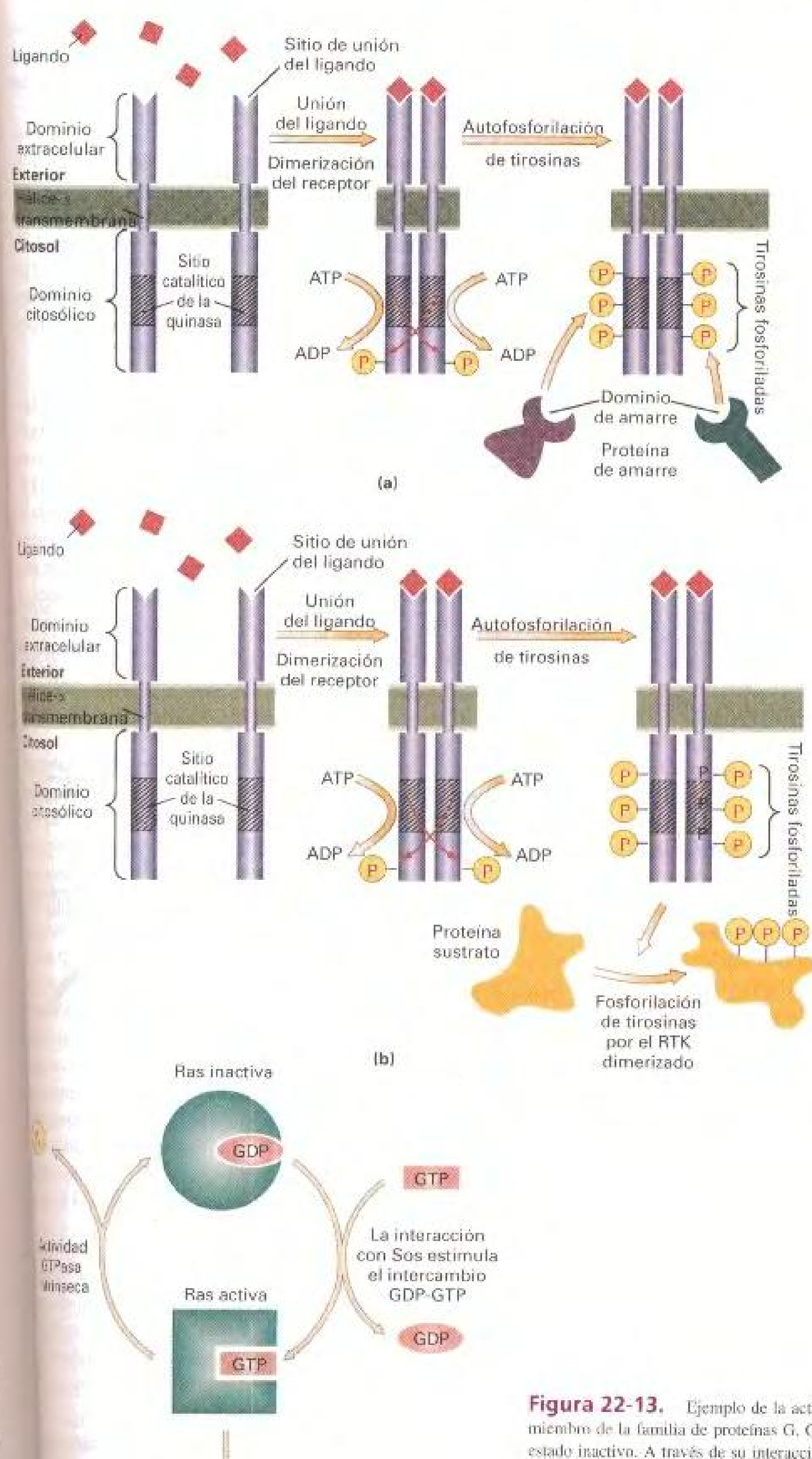


Figura 22-12. Cambios en la actividad del RTK y en la cascada de transducción de señales provocados por la unión de un ligando. La dimerización del RTK produce su autofosforilación. El RTK así activado inicia la transducción de señales mediante dos rutas diferentes: (a) funcionando como sitio de anclaje para algunas de las proteínas implicadas en el proceso y (b) fosforilando otras proteínas. (a) La autofosforilación genera sitios de unión para proteínas *adaptadoras* (o proteínas de «amarre»), que se unen a sitios que contienen residuos de tirosina fosforilados de forma específica. Mediante el amarre de proteínas adaptadoras diferentes, de forma que queden muy próximas entre sí, se producen cambios conformacionales en éstas que activan sus funciones de transducción de señales. (b) Otra consecuencia de la dimerización y autofosforilación del RTK es la fosforilación directa de otras proteínas *sustrato*, que induce sus actividades de transducción de señales. (Adaptado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)

Figura 22-13. Ejemplo de la actividad cíclica de una proteína G. Ras es un miembro de la familia de proteínas G. Cuando Ras está unida a GDP, se encuentra en estado inactivo. A través de su interacción directa con Ras, otra proteína denominada Sos provoca cambios conformacionales en Ras, de modo que pasa a unirse preferentemente a GTP. El complejo Ras-GTP se libera de Sos e hidroliza el GTP para transformarlo en GDP, volviendo así al estado inactivo Ras-GDP. (Adaptado de J. D. Watson, m. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 por James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski y Mark Zoller.)



Figura 22-14. Ruta de señalización mediada por RTK. Raf, MEK y MAP quinasa son tres quinasas citoplásmicas que se activan secuencialmente en la cascada de transducción de señales. (Adaptado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)

ce a la activación de una proteína que se une al complejo inactivo GDP-proteína G; esta unión produce un cambio conformacional en la proteína G que hace que pase a unirse preferentemente a una molécula de GTP (Fig. 22-13). La proteína Ras es una proteína de tipo G que, como veremos más adelante, juega un papel primordial en el proceso de carcinogénesis.

La proteína G activada, unida a GTP, se une a una quinasa citoplásmica, provocando un cambio conformacional en esta última que conduce a su activación. La quinasa activa fosforila una serie de proteínas diana, entre las que se incluyen otras quinasas. (En el ejemplo de la Fig. 22-14, las quinasas situadas en los pasos inferiores de la cascada se denominan Raf, MEK y MAP). Algunas de las proteínas fosforiladas por estas quinasas son factores de transcripción. La fosforilación cambia sus conformaciones, provocando la activación de la transcripción de algunos genes y la represión de otros (Fig. 22-14).

La transmisión de señales intercelulares depende de cambios conformacionales. Hemos visto que la unión ligando-receptor y la transducción de señales dentro de las células son procesos que dependen de cambios conformacionales. Por ejemplo, los causados por la unión de los ligandos a los receptores activan las rutas de transmisión de señales. Del mismo modo, los cambios conformacionales de las quinasas les permiten fosforilar aminoácidos específicos de proteínas concretas, y otras proteínas cambian de conformación cuando se unen a GTP. Estos cambios conformacionales no sólo permiten una respuesta rápida a la señal inicial sino que además son fácilmente reversibles, permitiendo que se pueda anular rápidamente la señal, y que los componentes del sistema de transducción de señales sean reciclados y estén así preparados para recibir nuevas señales.

El ciclo celular: controles extracelulares positivos. La división celular se induce por la acción de **mitógenos**, ligandos proteicos que suelen tener un origen paracrino (cercano). Muchos mitógenos, también denominados factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidérmico EGF (del inglés *Epidermal Growth Factor*), funcionan activando los RTK e iniciando el tipo de cascada de transducción de señales descrito hasta ahora.

El ciclo celular: controles extracelulares negativos. Algunas proteínas secretadas inhiben la división celular. Un ejemplo es la proteína TGF-β, un ligando que parece que se secreta a una variedad de tejidos cuando debe inhibirse el crecimiento. El ligando TGF-β se une al receptor correspondiente y estimula su actividad quinasa de serina/treonina. Esta activación conduce a la fosforilación de unas proteínas denominadas SMAD, que producen modificaciones en las actividades transcripcionales, y quizás también en la fosforilación de otros sustratos. Como resultado de esta cascada de transducción de señales, se bloquea la fosforilación y consiguiente inactivación de la proteína Rb. Re-

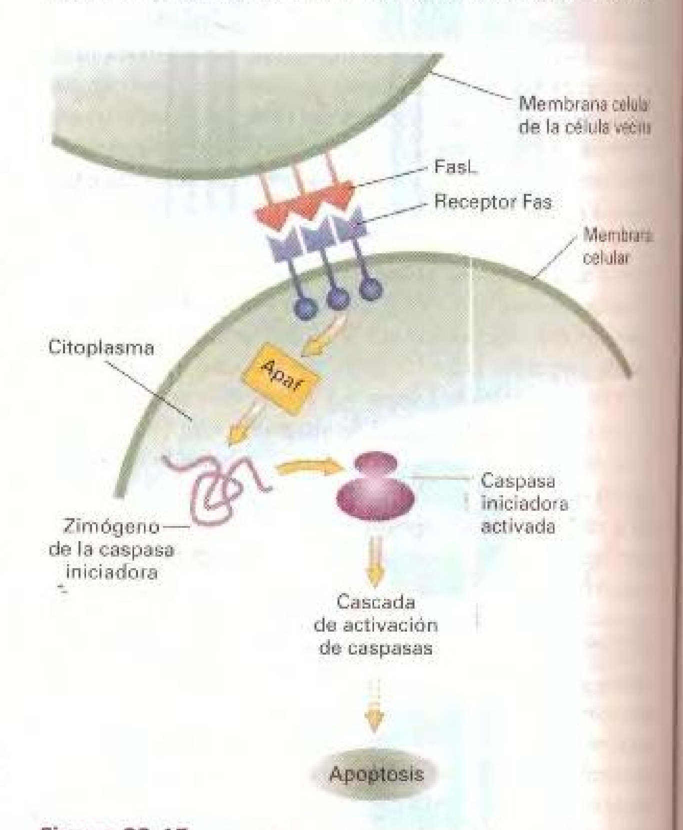


Figura 22-15. Control extracelular positivo de la apoptosis. Una molécula como Apaf se activa al unirse a FasL, que se encuentra anclada en la superficie exterior de una célula adyacente. FasL se une al receptor transmembrana Fas de la célula que sufrirá la apoptosis. La activación de Apaf causa la proteólisis y consecuente activación de la caspasa iniciadora que, a su vez, provoca la proteólisis y activación de otras caspasas, conduciendo finalmente a la apoptosis de la célula (Adaptado de S. Nagata, *Cell* 88, 1997, 35



Figura 22-16. Elementos implicados en el control del número celular.

Recordemos que, como comentamos anteriormente en este capítulo, la función de la proteína Rb en el ciclo celular es impedir la activación del factor de transcripción E2F. Por lo tanto, al mantener Rb activada, se impide la acción del factor E2F y se bloquea la progresión del ciclo celular.

Apoptosis: controles extracelulares positivos. A menudo, la orden de autodestrucción proviene de una célula vecina. Por ejemplo, dentro del sistema inmunitario, sólo un pequeño porcentaje de células B y T maduran para producir anticuerpos funcionales y proteínas receptoras de células T, respectivamente. Si las células B y T inmaduras, y no funcionales, no fueran eliminadas por inducción del proceso de autodestrucción, podrían colapsar el sistema inmunitario. La señal de autodestrucción se activa a través del sistema Fas (Fig. 22-15). Una proteína de membrana en la superficie celular denominada FasL (del inglés *FAS Ligand*) se une a los receptores Fas situados en la superficie de una célula adyacente. Esta interacción induce la trimerización del complejo ligando-receptor y la de un dominio citoplásmico del receptor transmembrana Fas. La trimerización, a su vez, activa directa o indirectamente una molécula como Apaf (de la que hablamos anteriormente en este mismo capítulo), que activa la caspasa iniciadora y, con ello, la cascada de caspasas.

Apoptosis: controles extracelulares negativos. Se conoce también la existencia de factores secretados que actúan bloqueando la activación de la ruta de apoptosis, es decir, controles negativos del proceso, que se han denominado **factores de supervivencia**. Sin embargo, todavía no se tiene una idea clara de los mecanismos que emplean para ejercer este control.

COROLARIO

Los sistemas de comunicación intercelular transmiten instrucciones entre las células para que proliferen o detengan la progresión del ciclo celular, y para que inicien o pospongan la autodestrucción.

Una visión integrada sobre el control del número celular

En los apartados anteriores hemos visto que existen varias maneras de regular el número de células. Existen rutas que controlan la proliferación celular y la autodestrucción, y la activación de estas rutas requiere la presencia de un conjunto específico de estímulos positivos y la ausencia de estímulos negativos o inhibidores. Las células no sólo disponen de mecanismos para evaluar su propio estado en relación con su capacidad de proliferación o de supervivencia, sino que además las células vecinas pueden transmitirles información mediante el envío de señales intercelulares (Fig. 22-16).

El cáncer: genética del control celular aberrante

La base del análisis genético es el convencimiento de que podemos aprender mucho sobre los procesos biológicos normales y sobre las enfermedades mediante el estudio de las propiedades de las mutaciones que alteran dichos procesos. Esto es algo que ciertamente observamos en relación con el cáncer. Ha quedado establecido que prácticamente todos los tumores de las células somáticas se deben a una serie de mutaciones específicas que se acumulan dentro de la célula. Se está comprobando que estas mutaciones pueden clasificarse en un número reducido de categorías principales: las que aumentan la capacidad proliferativa de las células, las que disminuyen la susceptibilidad de una célula a la apoptosis, o las que producen un incremento en la tasa general de mutación de la célula, aumentando así la probabilidad de que ocurran mutaciones que afecten a la proliferación o la apoptosis. Podemos esperar que este mejor conocimiento de los sucesos básicos asociados al desarrollo de los tumores se traduzca en un futuro en mejoras en el diagnóstico, tratamiento y control de este grupo de enfermedades.



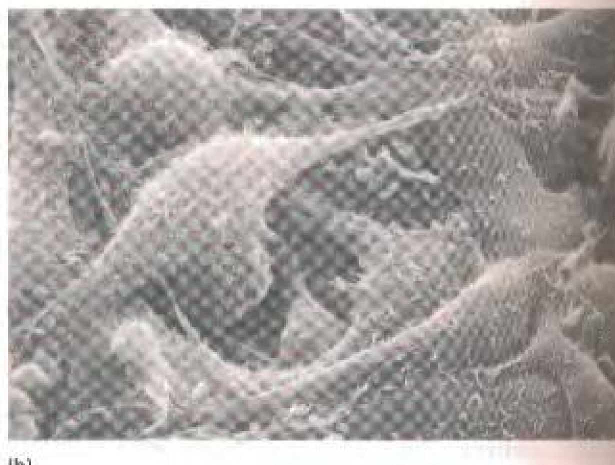


Figura 22-17. Microfotografías electrónicas de barrido de (a) células normales y (b) células transformadas con el virus del sarcoma de Rous, un virus que infecta las células con el oncogén *src*. (a) Una línea celular normal denominada 3T3. Puede verse cómo las células forman una estructura organizada en monocapa. (b) Una línea transformada derivada de 3T3. Las células adoptan una morfología más redondeada y se apilan unas sobre otras. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books.)

Diferencias entre células normales y células cancerosas

Un tumor maligno, o cáncer, es de naturaleza clonal. Un **cáncer** está compuesto por un agregado de células, todas ellas derivadas de una célula fundadora aberrante, que a pesar de estar rodeado por células normales, ha dejado de estar integrado en ese entorno. Las células cancerosas suelen distinguirse de las células normales que las rodean por una serie de cambios fenotípicos específicos, tales como una tasa rápida de división, la invasión de nuevos territorios celulares, una tasa metabólica elevada y una morfología anormal. Por ejemplo, cuando las células epiteliales normales se colocan en un medio de cultivo, sólo crecen si están adheridas a la superficie de la placa de Petri, dividiéndose hasta que constituyen una monocapa continua. Entonces, de alguna manera, reconocen que han formado una capa epitelial sencilla y dejan de dividirse. Por el contrario, las células malignas derivadas de tejido epitelial continúan proliferando y se apilan unas sobre otras (Fig. 22-17). Claramente, los factores que regulan la diferenciación celular normal deben estar alterados. ¿Cuál es entonces la causa que produce el cáncer? Muchos tipos celulares diferentes pueden sufrir la transformación a un estado maligno. ¿Existe una base común en la ontogenia de los diferentes tipos de tumores o, por el contrario, cada uno surge de un modo diferente? Parece que, en efecto, podemos hablar de un mecanismo general común que consiste en la acumulación de múltiples mutaciones en una sola célula que provocan su proliferación descontrolada. Algunas de estas mutaciones pueden transmitirse de padres a hijos a través de la línea germinal. Otras surgen de novo en el linaje celular somático de una célula determinada.

Pruebas que apoyan el origen genético del cáncer

Existen varias pruebas que apuntan a que la transformación de las células de un estado benigno a un estado canceroso tiene un origen genético. La mayoría de los agentes carcinogénicos (determinados compuestos químicos y las radiaciones) también son mutagénicos. Existen casos aislados, como el retinoblastoma familiar, en los que el cáncer se hereda como un factor mendeliano sencillo con alta penetrancia. Sin embargo, el caso más general está representado por alelos de susceptibilidad con un nivel de penetrancia menor, que aumentan la predisposición a desarrollar un tipo determinado de cáncer. En los últimos años, se han cartografiado (mediante análisis de recombinación y ligamiento a RFLP) y clonado varios genes de susceptibilidad. Los **oncogenes** son genes con un fenotipo mutante dominante que contribuyen al desarrollo de tumores en los mamíferos y que se han aislado a partir de virus tumorales (virus que provocan la transformación de células normales en células tumorales en determinados organismos). Estos oncogenes dominantes también pueden aislarse a partir de las células tumorales, utilizando ensayos con células en cultivo que permiten distinguir las células benignas de las malignas. Los tumores no aparecen como consecuencia de sucesos genéticos individuales sino que más bien son el resultado de la combinación de múltiples sucesos que producen la acumulación de varias mutaciones específicas dentro de la misma célula, convirtiéndola en cancerosa. En algunos de los casos mejor estudiados, como el cáncer de colon y el astrocitoma (un tumor cerebral), se ha demostrado que la progresión del cáncer implica la acumulación secuencial de varias mutaciones diferentes en las células malignas (Fig. 22-18). En los siguientes apartados, seguiremos analizando el origen genético del cáncer y la naturaleza de las proteínas alteradas por las mutaciones que provocan el

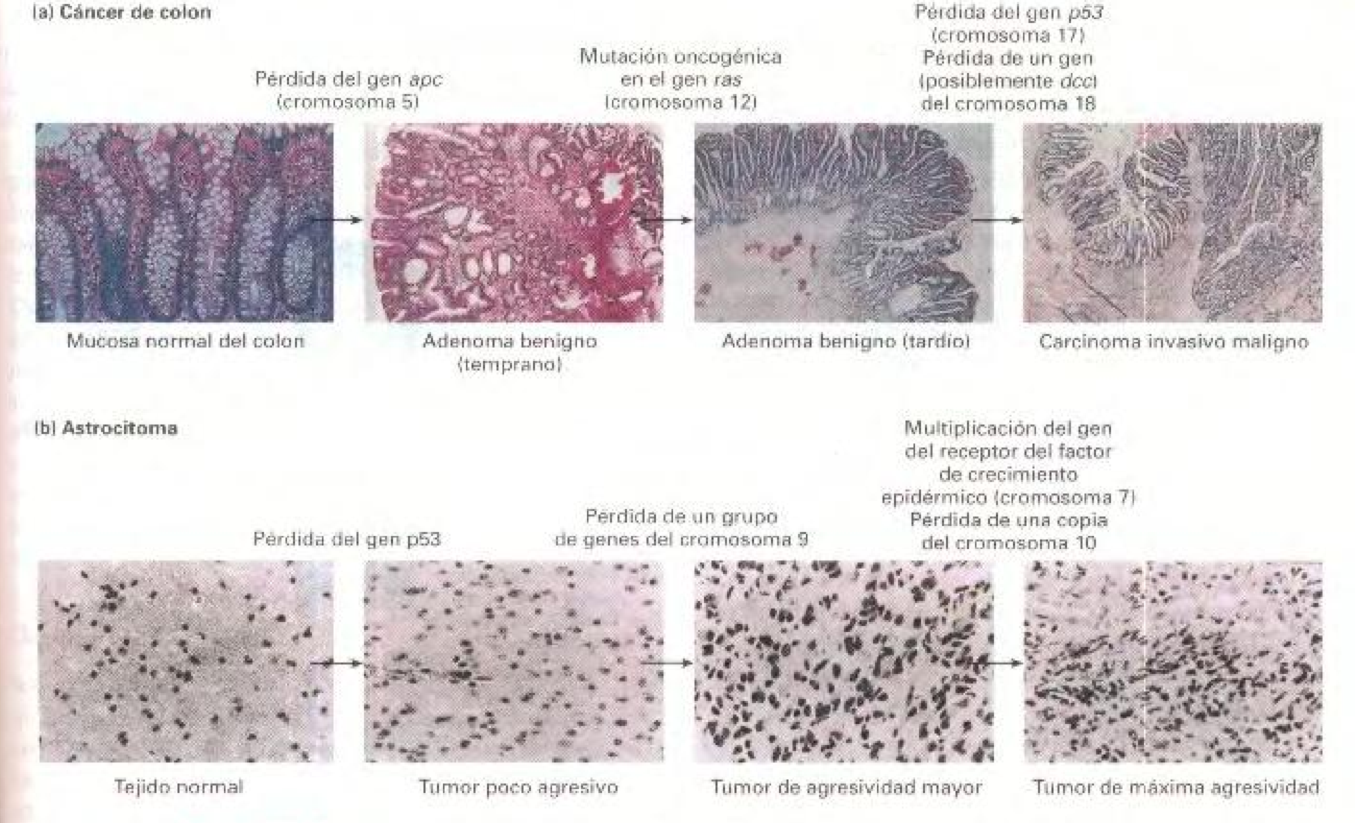


Figura 22-18. Pasos sucesivos en la progresión del cáncer de colon y de un tumor cerebral. Histológicamente, pueden distinguirse varias etapas en la progresión de estos tejidos desde el estado normal hasta la formación de tumores benignos y su posterior malignización. (a) Secuencia habitual de acumulación de mutaciones en la progresión del cáncer de colon. Puede verse cómo el tejido se va desorganizando a medida que el tumor se maligniza. (b) Una serie de mutaciones características diferente marca la progresión del astrocitoma maligno, un tipo de tumor cerebral. (Micrologías de E. R. Fearon y K. C. Cho. De W. K. Cavanee y R. L. White, «The Genetic Basis of Cancer». Copyright © 1995, Scientific American Inc.).

desarrollo de tumores. Veremos que muchas de estas proteínas participan en la comunicación intercelular y en la regulación del ciclo celular.

COROLARIO

Los tumores surgen como consecuencia de la acumulación secuencial de una serie de mutaciones que conducen a un estado de proliferación descontrolada.

Mutaciones en las células cancerosas

Existen dos tipos generales de mutaciones asociadas a los tumores: las mutaciones en los oncogenes y las mutaciones en los genes supresores de tumores. Las mutaciones en los oncogenes hacen que las proteínas correspondientes estén permanentemente activadas en las células tumorales portadoras del alelo mutante dominante. Típicamente, una célula tumoral será heterocigótica para la mutación en el oncogén. Los alelos promotores de tumores en los **genes supresores de tumores** dan lugar a productos proteicos inactivos. Estas mutaciones son recesivas y, por lo tanto, las células tumorales serán homocigóticas para la mutación.

¿Cómo se han identificado las mutaciones que inducen el desarrollo de tumores? Se han utilizado varias estrategias. Es un hecho establecido que muchos tipos de cáncer «vienen de familia». Con el uso de las técnicas modernas de análisis de pedrigríes, pueden establecerse relaciones de ligamiento entre la tendencia a

CUADRO 22-1. Relación entre las funciones de las proteínas silvestres y los tipos de mutaciones inductoras de tumores que pueden surgir en los genes que cifran estas proteínas

Tipo de función de la proteína silvestre	Propiedades de las mutaciones inductoras de tumores
Induce la progresión del ciclo celular	Oncogén (ganancia de función)
Inhibe la progresión del ciclo celular	Gen supresor de tumores (pérdida de función)
Induce la apoptosis	Gen supresor de tumores (pérdida de función)
Inhibe la apoptosis	Oncogén (ganancia de función)
Induce la reparación del DNA	Gen supresor de tumores (pérdida de función)

padecer ciertos tipos de cáncer y marcadores moleculares tales como los microsatélites; en muchos casos, utilizando esta estrategia se han identificado con éxito los genes mutados. También ha resultado muy útil el análisis citogenético de las propias células tumorales. Muchos tipos de tumores se caracterizan por la presencia de translocaciones cromosómicas específicas o de deleciones de regiones cromosómicas concretas. En algunos casos, estas reorganizaciones cromosómicas están tan invariablemente asociadas a un tipo determinado de cáncer que pueden utilizarse con fines diagnósticos. Por ejemplo, un 95 % de los pacientes de leucemia mielogénica crónica (LCM) presentan una translocación característica entre los cromosomas 9 y 22. Esta translocación, denominada cromosoma Filadelfia, en honor a la ciudad donde se describió por primera vez, es un elemento clave en la diagnosis de la LCM. Estudiaremos el cromosoma Filadelfia con mayor detalle en apartados posteriores de este capítulo. Otros tumores van asociados a la presencia de otras translocaciones; aquellas que tienen utilidad desde un punto de vista diagnóstico suelen aparecer en diversos tipos de cáncer de los leucocitos —leucemias y linfomas—. Sin embargo, no todas las mutaciones que inducen tumores son específicas de un tipo de cáncer. Es bastante frecuente que las mismas mutaciones aparezcan asociadas a muchos tipos diferentes de cáncer.

COROLARIO

Las mutaciones que inducen la formación de tumores pueden identificarse de varias maneras. Una vez localizadas, pueden clonarse para analizar cómo contribuyen al estado maligno.

Resulta obvio que las mutaciones que incrementan la tasa de proliferación celular causen tumores. Sin embargo, no resulta tan obvio que también causen tumores las mutaciones que disminuyen la probabilidad de que una célula sufra apoptosis. Parece que existen dos razones: (1) una célula incapaz de llevar a cabo el proceso apoptótico dispone de un margen de tiempo mu-

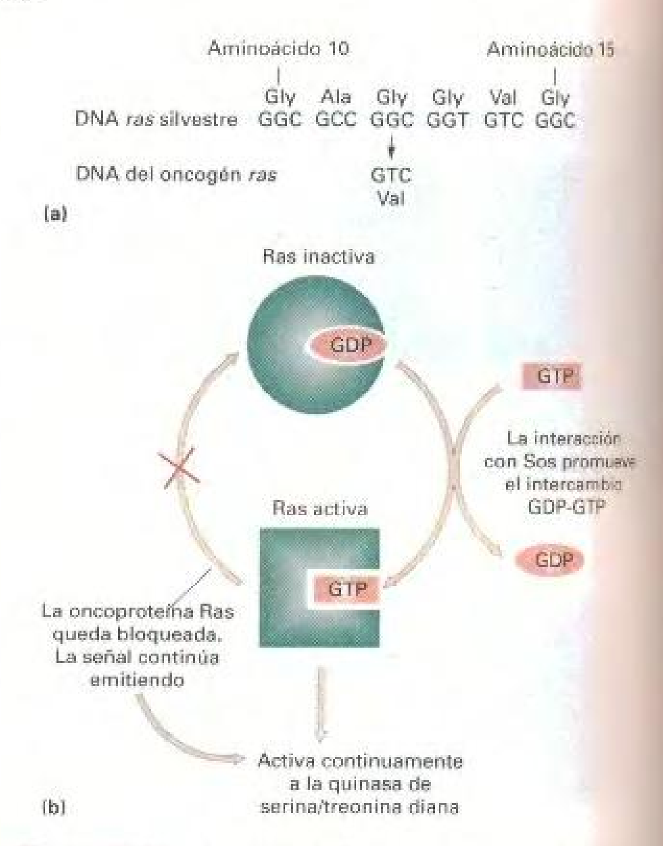


Figura 22-19. La oncoproteína Ras. (a) El oncogén *ras* difiere del gen silvestre en un solo par de bases en el codón número 12 de la secuencia de lectura abierta, y da lugar a una oncoproteína Ras, que difiere de la proteína normal en un aminoácido. (b) El efecto de esta mutación de cambio de sentido en la oncoproteína Ras es su incapacidad de hidrolizar el GTP a GDP (compárese con el ciclo normal de Ras que se muestra en la Fig. 22-13). Este defecto hace que la oncoproteína Ras permanezca en el estado activo Ras-GTP y active continuamente a la quinasa de serina/treonina diana (Fig. 22-14).

CUADRO 22-2. Algunos oncogenes bien caracterizados y sus productos

	PROPIEDADES DE LA PROTEÍNA	
Oncogén	Localización	Función
Reguladores de la transcripción nucleares		
jun	Núcleo	Factor de transcripción
fos	Núcleo	Factor de transcripción
erbA	Núcleo	Miembro de la familia de receptores de esteroides
Transductores de señales intracelulares		
abl	Citoplasma	Quinasa de tirosina
raf	Citoplasma	Quinasa de serina
gsp	Citoplasma	Subunidad α de una proteína G
ras	Citoplasma	Proteína de unión a GDP/GTP
Mitógenos		
sis	Extracelular	Factor de crecimiento secretado
Receptores de mitógenos		
erbB	Transmembrana	Receptor-quinasa de tirosina
fms	Transmembrana	Receptor-quinasa de tirosina
Inhibidores de la apoptosis		
bcl2	Citoplasma	Inhibidor de la cascada de caspasas

cho más largo para acumular mutaciones promotoras de la proliferación; (2) el tipo de daños y cambios fisiológicos que ocurren dentro de la célula tumoral normalmente inducen la ruta de autodestrucción.

La clasificación de una mutación del ciclo celular o de la ruta apoptótica como un oncogén dominante o como una mutación recesiva en un gen supresor de tumores depende de cómo contribuye la proteína normal correspondiente a la regulación de la proliferación celular o de la muerte celular programada (Cuadro 22-1). Por lo general, los genes que cifran proteínas que regulan positivamente el ciclo celular o bloquean la apoptosis pueden convertirse en oncogenes cuando mutan; los alelos correspondientes serían mutaciones de *ganancia de función*. Por otro lado, los genes que cifran proteínas que regulan negativamente el ciclo celular o que regulan positivamente la apoptosis se encuadran en la clase de los genes supresores de tumores; en estos casos, los alelos que inducen tumores corresponderían a mutaciones de *pérdida de función*.

Clases de oncogenes

Se han identificado en torno a 100 oncogenes diferentes (el Cuadro 22-2 incluye algunos ejemplos). ¿Cómo funcionan los protooncogenes, los genes correspondientes normales, no mutados? Los protooncogenes suelen cifrar una clase de proteínas que se activan selectivamente sólo en presencia de las señales reguladoras adecuadas. Como ya se ha mencionado, muchos de los productos de los protooncogenes son elementos reguladores positivos del ciclo celular, entre los que se incluyen receptores de factores de crecimiento, proteínas implicadas en la transducción de señales y factores de transcripción. Otros productos de los protooncogenes funcionan regulando negativamente el proceso apoptótico. Las mutaciones oncogénicas producen el desacoplamiento entre la oncoproteína mutante y el proceso de regulación encargado de su activación, lo que se traduce en la actividad descontrolada y continuada de la oncoproteína (Fig. 22-19). Las diferentes categorías de oncogenes nos muestran de qué diversas maneras se puede producir este desacoplamiento. Examinaremos algunos ejemplos.

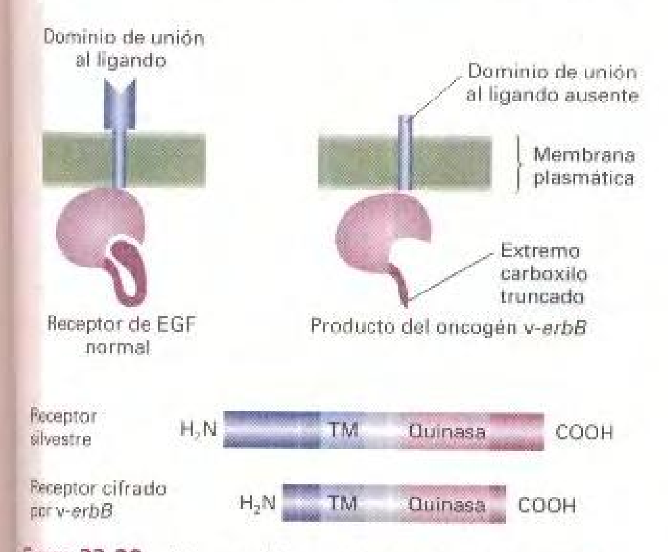


Figura 22-20. Una mutación oncogénica que afecta la señalización intracelular. EGFR, el receptor normal del factor de crecimiento epidérmico (EGF), tiene un dominio de interacción con el ligando en el exterior celular, un dominio transmembrana que permite que la proteína atraviese la membrana plasmática y un dominio intracelular que tiene actividad quinasa específica de tirosina. Normalmente, la actividad quinasa requiere que el EGF se una al dominio de interacción con el ligando, y esto ocurre de modo transitorio. El virus del tumor de la eritoblastosis es portador del oncogén v-erbB, que cifra una forma mutante de EGFR que ha perdido elementos a ambos extremos. Estas deleciones provocan que la proteína mutante dimerice constitutivamente y, por tanto, se autofosforile de modo continuo, transmitiendo una señal constante a partir del receptor. (Adaptado de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 por James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski, y Mark Zoller.)

COROLARIO

Los oncogenes cifran oncoproteínas, versiones mutantes y no sometidas a regulación de proteínas cuya función normal es participar en el control positivo del ciclo celular o en el control negativo de la apoptosis.

Tipos de mutaciones oncogénicas

Mutaciones puntuales. La transformación de una proteína normal en oncoproteína suele implicar modificaciones estructurales de la propia proteína, que pueden estar causadas por una simple mutación puntual. Por ejemplo, un solo cambio de base que convierta una glicina en una valina en el aminoácido 12 de la proteína Ras humana genera una oncoproteína que se ha encontrado asociada al cáncer de vejiga (Fig. 22-19*a*). Recordemos que la proteína Ras normal es una subunidad de una proteína G que, como se describió con anterioridad en este capítulo, está implicada en la transducción de señales y funciona alternando entre un estado activo (unida a GTP) y un estado inactivo (unida a GDP) (Fig. 22-13). El cambio de aminoácido provocado por la mutación oncogénica de cambio de sentido *ras* produce una proteína que siempre se une a GTP (Fig. 22-19*b*), incluso en ausencia de las señales habituales, como es la fosforilación de Ras, necesaria para que la proteína silvestre se una a GTP. De este modo, la oncoproteína Ras transmite de forma continua una señal que promueve la proliferación celular.

Pérdida de dominios proteicos. Las alteraciones estructurales también pueden deberse a la deleción de algunas partes de la proteína. El producto del oncogén *v-erbB* es una forma mutante de EGFR, un receptor de tipo RTK cuyo ligando es el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Fig. 22-20). La forma mutante de EGFR carece del dominio extracelular que interacciona con el ligando y de algunos componentes reguladores del dominio citoplásmico. La consecuencia de estas deleciones es que la oncoproteína EGFR, producto del oncogen *v-erbB*, es capaz de dimerizar de forma constitutiva, incluso en ausencia del ligando EGF. El dímero está siempre autofosforilado, debido a su propia actividad quinasa de tirosina, de modo que la cascada de transducción de señales se encuentra continuamente activada.

Fusiones génicas. Probablemente, el tipo más llamativo de oncoproteína alterada estructuralmente es el resultante de una fusión génica. El ejemplo clásico de genes fusionados proviene del estudio del cromosoma Filadelfia que, como mencionamos anteriormente, consiste en una translocación entre los cromoso-

Centrómero

mRNA *bcr1* normal

Cromosoma 22

Gen *bcr1*

Cromosoma 9

Gen *c-abl*

Recombinación

mRNA híbrido *bcr1-abl*

Translocación (9;22)

Proteína de fusión Bcr-Abl

Figura 22-21. Reorganización cromosómica en la leucemia mieloide crónica (LMC). El cromosoma Filadelfia, que se utiliza para el diagnóstico de la LMC, es una translocación entre los cromosomas 9 y 22. Los puntos de ruptura de la translocación están en medio del gen *c-abl*, que cifra una quinasa de tirosina citoplásmica, y del gen *brc1*, que también se piensa que corresponde a una quinasa. La translocación produce una proteína híbrida Bcr1-Abl que carece de los controles normales que inhiben la actividad quinasa de tirosinas de Abl. En el esquema se muestra sólo uno de los cromosomas reorganizados. (Adaptado de J.D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 por James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski, y Mark Zoller.)

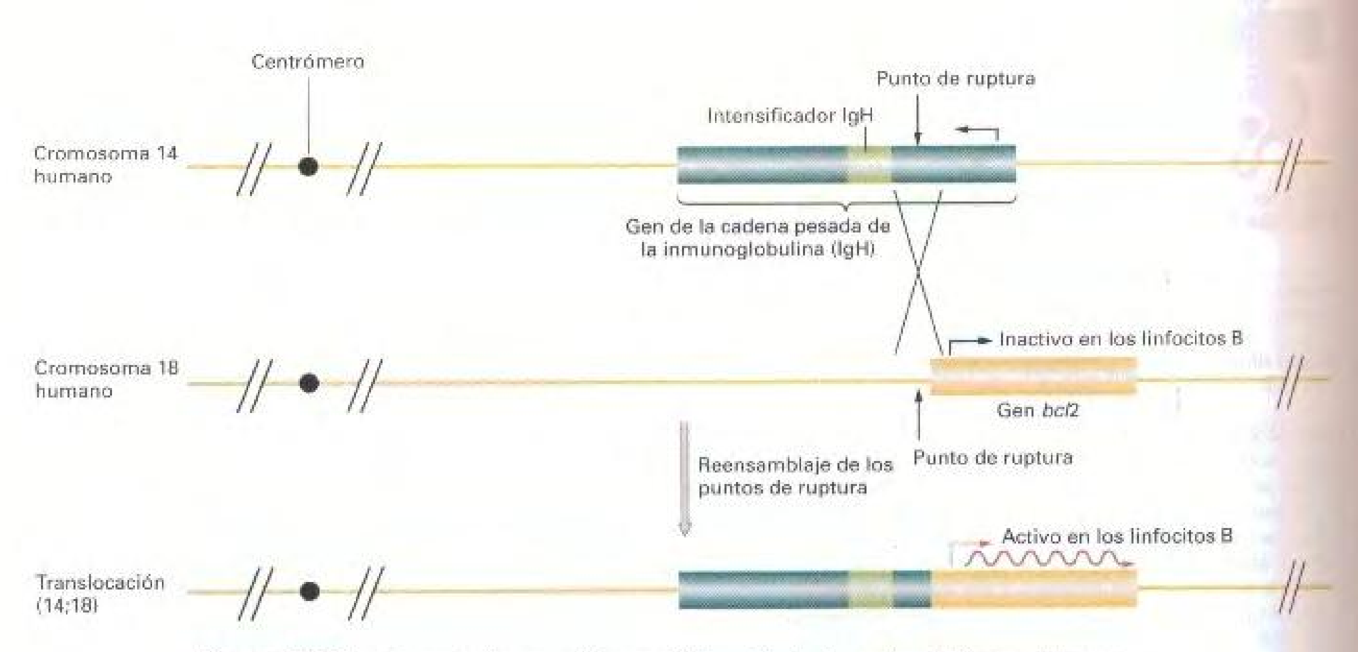


Figura 22-22. Reorganización cromosómica en el linfoma folicular. La translocación fusiona el elemento intensificador de la transcripción de un gen, en el cromosoma 14, que cifra una subunidad proteica de un anticuerpo (la subunidad IgH, también conocida como la cadena pesada de la inmunoglobulina), con la unidad transcripcional de un gen del cromosoma 18 que cifra Bcr2, un regulador negativo de la apoptosis. De este modo, la proteína Bcr2 se expresa en las células productoras de anticuerpos, impidiendo que cualquier tipo de señal induzca la apoptosis en esas células.

mas 9 y 22 utilizada en el diagnóstico de la leucemia mielogénica crónica (LMC). Mediante el uso de técnicas de DNA recombinante se ha demostrado que los puntos de ruptura de la translocación en el cromosoma Filadelfia son bastante parecidos en diferentes enfermos de LMC y que provocan la fusión entre dos genes, *bcr1* y *abl* (Fig. 22-21). El protooncogén *abl* cifra una quinasa de tirosina citoplásmica. La oncoproteína de fusión Bcr1-Abl presenta una actividad quinasa constitutiva que es responsable de su estado oncogénico.

Algunos oncogenes producen una oncoproteína con una estructura idéntica a la de la proteína normal. En estos casos, la mutación oncogénica induce la expresión inadecuada de la proteína, es decir, la expresión en tipos celulares en los que la proteína no aparece normalmente. Varios de los oncogenes que producen una expresión inadecuada son consecuencia de translocaciones cromosómicas que han sido asociadas a tumores de linfocitos B. Los linfocitos B y sus descendientes, las células plasmáticas, son las células que sintetizan los anticuerpos o inmunoglobulinas. Estas translocaciones oncogénicas de las células B no dan lugar a una proteína de fusión, sino que la reorganización cromosómica provoca que un gen cercano al punto de ruptura se exprese en un tejido erróneo. Un 85 % de los pacientes de linfoma folicular presentan una translocación entre los cromosomas 14 y 18 (Fig. 22-22). Cerca del punto de ruptura del cromosoma 14 se encuentra un intensificador de la transcripción de uno de los genes de las inmunoglobulinas. La translocación de este elemento intensificador produce su fusión al gen *bcl2*, que es un regulador negativo de la apoptosis. La fusión intensificador-*bcl2* provoca la síntesis de cantidades elevadas de Bcl2 en los linfocitos B. Este exceso de Bcl2 bloquea la apoptosis en los linfocitos B mutantes y, de este modo, alarga anormalmente el tiempo de vida de estas células, aumentando así la probabilidad de que adquieran mutaciones promotoras de la proliferación celular. Existe un fuerte paralelismo entre este tipo de mutación oncogénica

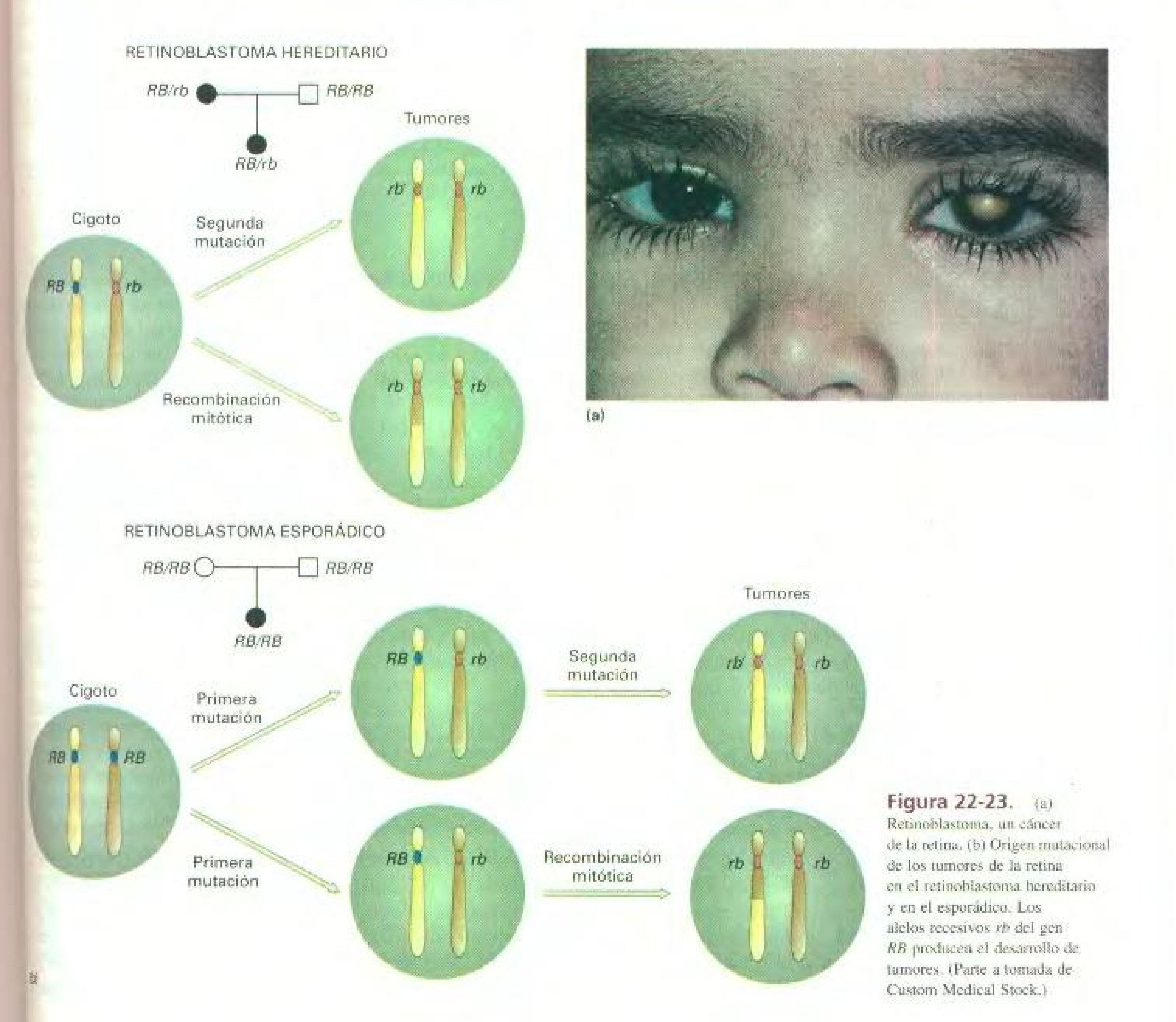


Figura 22-23. (a) Retinoblastoma, un cáncer de la retina. (b) Origen mutacional de los tumores de la retina en el retinoblastoma hereditario y en el esporádico. Los alelos recesivos *rb* del gen *RB* producen el desarrollo de tumores. (Parte a tomada de Custom Medical Stock.)

dominante y los fenotipos dominantes de ganancia de función provocados por el alelo *Tab* del gen *Abd-B*, en el que también se produce la fusión del intensificador de la transcripción de un gen con la unidad transcripcional de otro (Cap. 23). En ambos casos, la introducción de un intensificador provoca un fenotipo dominante de ganancia de función debido a la regulación inadecuada de la unidad transcripcional. No obstante, las mutaciones como *Tab* surgen en la línea germinal y se transmiten de una generación a la siguiente, mientras que la mayoría de las mutaciones oncogénicas surgen en las células somáticas y no se transmiten a la descendencia.

COROLARIO

Los oncogenes dominantes contribuyen al estado oncogénico provocando que una proteína se encuentre en una forma constitutivamente activada o se exprese en las células erróneas.

Clases de genes supresores de tumores

Las funciones normales de los genes supresores de tumores pueden clasificarse en categorías complementarias a las de los protooncogenes (Cuadro 22-1). Algunos genes supresores de tumores cifran elementos reguladores negativos del ciclo celular, tales como la proteína Rb o los componentes de la ruta de transducción de la señal del TGF-β. Otros cifran factores reguladores positivos de la apoptosis (al menos, parte de la función de *p53* podría incluirse en esta categoría). Otros actúan indirectamente, provocando un aumento generalizado de la tasa de mutación. Consideraremos dos ejemplos.

Herencia del fenotipo tumoral

En el caso del retinoblastoma, se produce una mutación en el gen que cifra la proteína Rb, implicada en la regulación del ciclo celular (como vimos anteriormente). El retinoblastoma afecta principalmente a niños de corta edad y se caracteriza por la proliferación descontrolada de las células de la retina que carecen de una copia funcional del gen *RB*. Las células mutantes pueden ser homocigóticas para un mismo alelo *rb* o heterocigóticas para dos alelos mutantes *rb* diferentes. La mayoría de los pacientes presentan uno o varios tumores localizados en una región concreta de un solo ojo, y la enfermedad se presenta de modo esporádico, es decir, la familia no tiene antecendentes de retinoblastoma y la persona afectada no lo transmite a su descendencia. En estos casos, el retinoblastoma no se transmite porque la mutación o mutaciones *rb* que inactivan ambos alelos surgen en una célula somática cuyos descendientes forman parte de la retina (Fig. 22-23). Presumiblemente, las mutaciones surgen por azar en momentos diferentes del desarrollo, pero en el mismo linaje celular.

Algunos pacientes, sin embargo, manifiestan una forma heredada de la enfermedad denominada retinobastoma hereditario binocular (HBR, del inglés *Hereditary Binocular Retinoblastoma*). Estos pacientes desarrollan muchos tumores, y en ambas retinas. Paradójicamente, aun cuando *rb* es una mutación recesiva en la célula, la transmisión de HRB es autosómica dominante

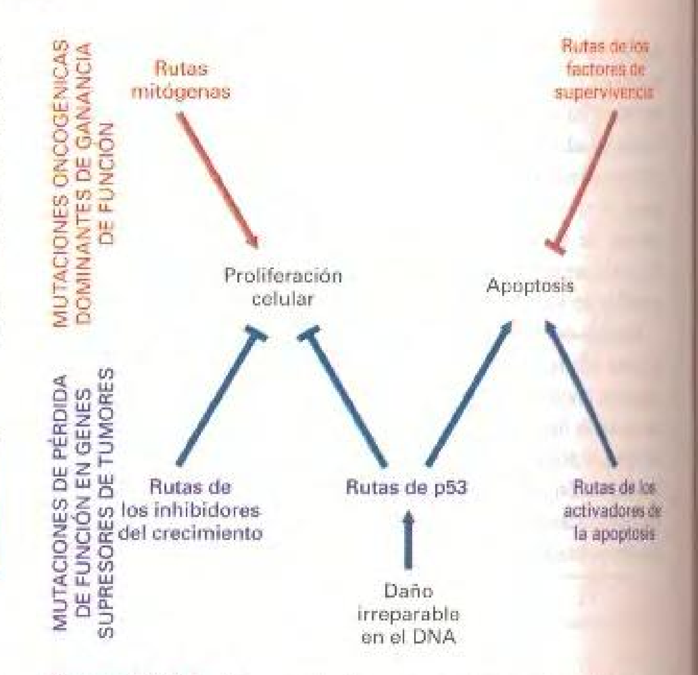


Figura 22-24. Rutas principales cuyas mutaciones están implicadas en la formación y progresión del cáncer. Los principales hechos que contribuyen a la formación de tumores son el incremento de las tasas de proliferación y supervivencia celular (la reducción de la apoptosis). Las rutas en rojo son susceptibles de sufrir mutaciones oncogénicas de ganancia de función. Las rutas en azul son susceptibles de sufrir mutaciones de pérdida de función en genes supresores de tumores.

(Fig. 22-23). ¿Cómo se resuelve esta contradicción? Si existe una mutación en la línea germinal que elimina una de las dos copias del gen *RB*, es bastante probable que, dada la tasa de mutación del gen *RB*, el otro alelo mute en algunas células de la retina, produciendo así células que carecen de proteína Rb funcional.

¿Por qué la ausencia de *RB* promueve el desarrollo de tumores? En los apartados dedicados al ciclo celular vimos que la proteína Rb funciona uniéndose al factor de trancripción E2F. La unión de la proteína Rb impide que el factor E2F active la transcripción de genes cuyos productos se necesitan para que ocurran determinados procesos específicos de la fase S tales como la replicación del DNA. La proteína Rb inactiva es incapaz de unirse al factor E2F, de tal manera que este factor queda libre para activar la transcripción de genes de la fase S. En células homocigóticas para el alelo nulo *rb*, la proteína Rb es inactiva de forma permanente. En estas condiciones, la fase S se encuentra continuamente activada por E2F y las células no muestran la parada normal del ciclo en la fase G1 tardía.

El gen supresor de tumores *p53*: un elemento común al ciclo celular y la apoptosis

El análisis de mutaciones recesivas asociadas a la formación de tumores ha permitido la identificación de otro gen clave: el gen supresor de tumores denominado *p53*. Las mutaciones en *p53* aparecen asociadas a muchos tipos de tumores: se ha estimado que un 50 % de los tumores humanos carecen de un gen *p53* funcional. La proteína p53 es un regulador transcripcional que se

activa en respuesta a la presencia de daños en el DNA y que desempeña un papel doble. Por un lado, impide la progresión del ciclo celular hasta que hayan sido reparados los daños en el DNA. Por otro lado, en determinadas circunstancias, induce la apoptosis. En ausencia de un gen *p53* funcional, la ruta apoptótica en la que participa p53 no se activa, y el ciclo celular progresa aunque no hayan sido reparados los daños en el DNA. La falta de este punto de control provoca un aumento generalizado en la frecuencia de mutaciones, reorganizaciones cromosómicas y aneuploidías. Como consecuencia, se incrementa la probabilidad de que aparezcan otras mutaciones que aumenten la proliferación celular o inhiban la apoptosis. Además de *p53*, se han identificado alelos mutantes recesivos inductores de tumores en otros genes implicados en la reparación de los daños en el DNA. Otros resultados apuntan a que los genes cuya pérdida de función produce un aumento en la tasa de mutación juegan un papel clave en la inducción de tumores en los seres humanos. Este tipo de mutaciones recesivas que interfieren con la reparación de los daños en el DNA promueven el desarrollo de tumores de forma indirecta; el incremento que producen en la tasa de mutación eleva la probabilidad de que surjan mutaciones en oncogenes o en genes supresores de tumores, que alterarían la regulación normal del ciclo celular y de la muerte celular programada.

COROLARIO

Las mutaciones en los genes supresores de tumores, al igual que las mutaciones en los oncogenes, actúan, directa o indirectamente, activando el ciclo celular o inhibiendo la apoptosis.

La complejidad del cáncer

Como hemos visto en este capítulo, existen muchas mutaciones diferentes que pueden provocar el desarrollo de tumores. Estas mutaciones están conceptualmente relacionadas y sus efectos pueden entenderse si se considera cómo alteran los procesos normales que controlan la proliferación y la apoptosis (Fig. 22-24). En algunos casos, como en el cáncer de colon (Fig. 22-18), hemos sido incluso capaces de identificar la secuencia de mutaciones que contribuyen a la progresión de una célula desde el estado normal, pasando por varios estados de tumor benigno, hasta la formación de un tumor verdaderamente maligno. Sin embargo, el cáncer es un fenómeno mucho más complejo. Incluso entre los tumores malignos, las tasas de proliferación y la capacidad para invadir otros tejidos son bastante diferentes. No cabe duda de que aun después de que se haya alcanzado el estado de malignidad, se acumulan nuevas mutaciones en las celulas tumorales que potencian todavía más su capacidad proliferativa y su invasividad. Por consiguiente, queda todavía mucho camino por recorrer hasta que dispongamos de una visión verdaderamente exhaustiva sobre cómo surgen y progresan los tumores.

La investigación sobre el cáncer en la era del análisis genómico

Es probable que a lo largo del año 2002 se disponga ya de la secuencia completa del genoma humano, lo que debería permitirnos obtener información sobre todos los productos génicos que cifra (RNA y proteínas). Gracias a ello, será posible analizar simultáneamente los niveles de expresión de todos los genes durante la formación y progresión de un tumor. Podemos esperar que este análisis sistemático nos proporcione una visión mucho más amplia del conjunto de alteraciones en la expresión génica que caracterizan a un tumor maligno. En realidad, este tipo de análisis se está abordando ya en la actualidad, aunque sólo se disponga de una muestra incompleta del transcriptoma total cifrado en el genoma humano. Los resultados así obtenidos hasta ahora indican que durante la progresión de los tumores actúa una red compleja de modulaciones en la expresión génica. Este tipo de estudios dará lugar posiblemente a la identificación de nuevos e inesperados oncogenes y de genes supresores de tumores, y al descubrimiento de otros factores que puedan influir, aunque sea de un modo sutil, sobre la susceptibilidad al desarrollo de tumores. El análisis genómico debe además constituir la base para el desarrollo de ensayos clínicos que evalúen la eficacia de posibles medicamentos anticancerígenos. Podemos esperar que las estrategias basadas en el análisis global del genoma representen una parte importante de la investigación sobre el cáncer en el siglo XXI.

RESUMEN

Las células eucarióticas superiores han desarrollado mecanismos que controlan su estructura y su capacidad de proliferar. Estos controles están perfectamente integrados y dependen de la evaluación continua del estado de la célula, y de la comunicación continua entre células vecinas y entre diferentes tejidos. En particular, existe una serie de mecanismos complejos que mantienen la coordinación de las diversas etapas del ciclo celular y permiten la progresión de éste sólo cuando se cumplen las condiciones ambientales adecuadas. Mediante otra serie de mecanismos se evalúa continuamente el estado de las células supervivientes y, si se detecta alguna célula anormal, se induce un programa de autodestrucción denominado apoptosis. El cáncer es una enfermedad genética de las células somáticas. En las células cancerosas, se acumulan múltiples mutaciones que perturban ambos procesos. En algunos casos, las mutaciones afectan directamente a estos mecanismos, mientras que en otros casos las mutaciones elevan de forma generalizada la tasa de mutación de la célula. Tanto las mutaciones oncogénicas de ganancia de función como las mutaciones de pérdida de función en los genes supresores de tumores contribuyen al desarrollo de tumores mediante el desacoplamiento de los controles normales que regulan el ciclo celular o la apoptosis.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

reparación del DNA / intensificador / oncogén / mutaciones de ganancia de función / quinasas dependientes de ciclina / apoptosis / puntos de control / ruta de transducción de señal / proliferación celular / RTK / gen supresor de tumores

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

Un niño afectado de retinoblastoma hereditario es heterocigótico para una mutación *rb*, que puede haber sido transmitida por uno de sus padres o haber surgido *de novo* por mutación en uno de los gametos que se fusionaron para dar lugar al niño. Las células heterocigóticas *RB/rb* no son malignas y es necesario que se elimine la función del alelo *RB* del heterocigoto en el tejido de la retina para que se produzca una célula tumoral. La pérdida de función del alelo *RB* puede producirse al sufrir una mutación independiente o por recombinación mitótica, dando lugar a la homocigosis de la mutación *rb* original.

a. Si el retinoblastoma se transmite también a otros hijos, ¿podríamos determinar si la mutación original procede del padre o de la madre? ¿Cómo?

b. ¿Podríamos determinar si la mutación *rb* tiene un origen materno o paterno si hubiera aparecido *de novo* en una célula germinal de uno de los padres?

♦ Solución ♦

a. Si el carácter es hereditario, podemos determinar cuál de los padres lo transmitió. La estrategia más directa sería la identificación de polimorfismos en el DNA, tales como polimorfismos en fragmentos de restricción (RFLP), ligados al gen *RB*. El alelo *rb* tiene la particularidad de mostrar una herencia autosómica dominante, aunque al nivel celular es recesivo. Dado el patrón de herencia dominante, si encontramos diferencias en el DNA de las regiones genómicas próximas a los cuatro alelos parentales, deberíamos ser capaces de determinar qué alelo ha sido transmitido a todos esos descendientes afectados. Este alelo común sería el mutante.

b. Si la mutación hubiera surgido *de novo* en uno de los gametos, sería posible determinar su procedencia, aunque con mucha dificultad. Podríamos utilizar técnicas de DNA recombinante para clonar las dos copias del gen *RB* a partir de células normales. Sólo uno de los dos alelos debería ser mutante, y la secuenciación de los dos genes clonados nos permitiría identificar la mutación que inactiva *RB*. Si ha surgido *de novo* por mutación en el espermatozoide o en el óvulo, esta mutación no debería estar presente en las células somáticas de los padres. Si la secuenciación pone de manifiesto la existencia de algunos polimorfismos (por ejemplo, en los sitios de reconocimiento de una enzima de restricción) que permitan distinguir entre los alelos parentales, podríamos analizar el DNA de los padres para determinar si los polimorfismos encontrados en el alelo mutante aparecen también en el padre o en la madre. (El éxito de esta estrategia dependerá de la naturaleza exacta de los alelos parentales y de la mutación).

Si la homocigosis de la mutación se hubiera originado por recombinación mitótica, deberíamos utilizar otras técnicas de análisis disponibles. En este caso, toda la región alrededor del gen *rb* sería homocigótica para el cromosoma mutante. Mediante el análisis de polimorfismos de DNA situados en esta región, deberíamos ser capaces de determinar si este cromosoma deriva de la madre o del padre. Así, llegaríamos a la solución al problema empleando un procedimiento similar al que se describe en el apartado a.

PROBLEMAS RESUELTOS

El virus del tumor de mama del ratón (MMTV, del inglés *Mouse Mammary Tumor Virus*) es un retrovirus oncogénico. Dicho virus provoca específicamente la formación de tumores en las glándulas mamarias de ratones hembra. A diferencia de otros retrovirus oncogénicos, el MMTV no contiene información para sintetizar una oncoproteína propia, como por ejemplo ocurre en el virus de la eritroblastosis, que contiene un oncogén *v-erbB*. Por el contrario, el MMTV únicamente cifra las proteínas que necesita para la transcripción inversa de su propio RNA a una copia de DNA que pueda integrarse en el genoma de la célula hospedadora, y las proteínas necesarias para su encapsidación. ¿Cómo actúa entonces el MMTV como un virus oncogénico?

Diversos estudios nos han proporcionado dos tipos de indicios para entender cómo el MMTV provoca la formación de tumores. En primer lugar, se ha descrito que el virus contiene un elemento de respuesta a hormonas (HRE, del inglés *Hormone Response Element*) que produce un fuerte incremento de la actividad transcripcional en respuesta a la presencia de determinadas hormonas esteroides. Otros resultados muestran que, por lo general, el virus se inserta una única vez en el genoma de los tumores de mama del ratón. Utilizando las técnicas de DNA recombinante habituales, se han clonado y estudiado las regiones del DNA adyacente a los sitios de inserción del MMTV a partir de un gran número de tumores originados de modo independiente. Estos análisis muestran que en los tumores de glándulas mamarias de

las ratonas, el sitio en el que se produce la integración del MMTV pertenece a un pequeño grupo de sitios posibles en el genoma, denominados *sitios Int*. (Por el contrario, en infecciones no tumorales, el MMTV puede integrarse en lugares muy variados del genoma). *Int1*, el primero de estos sitios de integración que fue estudiado, se encuentra inmediatamente adyacente a la región promotora de un gen que cifra una proteína secretada muy similar a la proteína *wg* de *Drosophila*, proteína que participa en la señalización intercelular durante la segmentación del embrión.

a. Teniendo en cuenta que el desarrollo de las glándulas mamarias en las hembras y la lactancia dependen de la acción de determinadas hormonas esteroides femeninas, y considerando los indicios expuestos, proponga una explicación de la actividad oncogénica del MMTV.

b. Diseñe un procedimiento experimental para comprobar esta hipótesis.

♦ Solución ♦

a. El HRE del MMTV actúa como un elemento intensificador portátil. Probablemente, el receptor de hormonas que activa el HRE se expresa únicamente en las glándulas mamarias, de modo que este HRE se comporta como un intensificador específico de este tejido. De este modo, si la integración del MMTV se produce cerca de un gen que, al ser activado en las glándulas mamarias femeninas, provoca la falta de regulación de la proliferación celular, podría ser el origen de un tumor. En el caso de *Int1*, por ejemplo, la proteína no se expresa en la glándulas mamarias, pero pasa a expresarse en grandes cantidades al ser controlado por el HRE del MMTV. En principio, esta situación es equivalente a la de los oncogenes dominantes producidos por reorganizaciones cromosómicas, como la que encontramos en el linfoma de Burkitt, en el que un intensificador *Ig* se fusiona al gen *c-myc* en los linfocitos B. En el caso del MMTV, es una inserción viral y no una translocación cromosómica la que produce la fusión génica.

b. Esta hipótesis propone que el HRE es el único elemento necesario del MMTV para su efecto oncogénico, y que actúa provocando una regulación incorrecta del gen *Int1*. Para probar esta hipótesis, podríamos aislar un pequeño fragmento de DNA que contuviera únicamente el HRE del virus, y fusionarlo *in vitro* con un gen *Int1* silvestre. Si inyectamos este DNA directamente en blástulas de ratón y hacemos que se integre al azar en el genoma mediante transformación de líneas germinales, esperaríamos que cada una de estas inserciones causara tumores de mama en las hembras. Deberíamos incluir además dos tipos de controles: primero, transformando líneas germinales con una construcción similar pero en la que la secuencia del gen *Int1* contuviera una mutación sin sentido que diera lugar a una proteína inactiva, y segundo, con otra construcción diferente en la que una mutación afectara al HRE de modo que fuera incapaz de unirse a su receptor de esteroides. Ninguna de estas construcciones debería ser oncogénica.

PROBLEMAS

1. Se considera que el cáncer es consecuencia de la acumulación de dos o más «sucesos», es decir, dos o más mutaciones en la misma célula, que afectan a la proliferación celular y a la supervivencia de la misma. Muchas de estas mutaciones oncogénicas son dominantes: una sola copia del gen es suficiente para cambiar las propiedades proliferativas de la célula. ¿Cuáles de los siguientes tipos generales de mutaciones podrían dar lugar a oncogenes dominantes? Justifique cada una de las respuestas.

   a. Una mutación que produzca un aumento del número de copias de un factor activador de la ciclina A.

   b. Una mutación sin sentido que esté situada poco después del inicio de la traducción de un gen del receptor de un factor de crecimiento.

   c. Una mutación que eleve los niveles de FasL.

   d. Una mutación que destruya el sitio activo de una quinasa de tirosina citoplásmica.

   e. Una translocación que fusione un gen de un inhibidor de la apoptosis con un intensificador de la trancripción específico de hígado.

2. Muchas de las proteínas que participan en la progresión del ciclo celular sufren modificaciones reversibles, mientras que las modificaciones que ocurren en una ruta apoptótica son irreversibles. Explíquense estas observaciones teniendo en cuenta la naturaleza y el resultado final de los dos procesos.

3. Normalmente, FasL está presente en las células sólo cuando es necesario transmitir una orden de apoptosis a las células vecinas. Supongamos que disponemos de una mutación que produce FasL en la superficie celular de todas las células del hígado.

   a. Si la mutación estuviera presente en la línea germinal, ¿esperaríamos que la mutación fuera dominante o recesiva?

   b. Si la mutación surgiera en los tejidos somáticos, ¿esperaríamos que indujera la formación de tumores? ¿Por qué?

4. Proporcione tres tipos de pruebas que apoyen la base genética del cáncer.

5. Algunos genes pueden convertirse en oncogenes cuando se eleva su número de copias. Esto, por ejemplo, se ha observado en el caso del gen que cifra el factor de transcripción Myc. Por otro lado, las mutaciones oncogénicas en *ras* son siempre mutaciones puntuales que alteran la estructura de la proteína Ras. Relacione estas observaciones con la función de las versiones normales y oncogénicas de Ras y Myc.

6. Actualmente, sabemos que las mutaciones que causan la inhibición de la apoptosis pueden inducir el desarrollo de tu-

mores. Dado que la proliferación no se induce directamente por inhibición de la apoptosis, proponga una explicación de cómo esta inhibición podría contribuir a la formación de tumores.

7. Una célula normal se ha convertido en cancerosa debido a la aparición de una mutación en un gen determinado. Supongamos que podemos introducir copias normales de este gen en la célula tumoral.

   a. Si las mutaciones fueran en un gen supresor de tumores, ¿podríamos esperar que los transgenes normales bloquearan la actividad promotora de tumores de las mutaciones? ¿Por qué?

   b. Si las mutaciones fueran de tipo oncogénico, ¿podríamos esperar que los transgenes bloquearan la actividad promotora de tumores? ¿Por qué?

8. La insulina es una proteína secretada por el páncreas (un órgano endocrino) cuando los niveles de azúcar en la sangre son elevados. La insulina actúa sobre muchos tejidos distantes uniéndose a un receptor con actividad quinasa de tirosina y activándolo; esta activación conduce a una reducción de los niveles de azúcar en la sangre mediante el almacenamiento apropiado de los productos del metabolismo de los azúcares.

   La diabetes es una enfermedad en la que los niveles de azúcar en la sangre permanecen altos debido a que algún paso de la ruta de la insulina está alterado. Un tipo de diabetes (llamémosla de tipo A) puede tratarse suministrando insulina al paciente. Otro tipo de diabetes (llamémosla de tipo B) no mejora cuando se suministra insulina.

   a. ¿Cuál de los tipos de diabetes es probable que se deba a un defecto en el páncreas y cuál a un defecto en las células diana? Justifique la respuesta.

   b. La diabetes de tipo B puede deberse a mutaciones en cualquiera de varios genes. Explique esta observación.

9. Los daños irreparables en el DNA pueden tener consecuencias tanto en el ciclo celular como en la apoptosis. Explique qué tipos de consecuencias y qué procesos utiliza la célula para que se manifiesten dichas consecuencias.

La vida de todos los organismos superiores comienza con una sóla célula, el óvulo recién fecundado, y alcanza su madurez con miles, millones o incluso miles de millones de células asociadas en un organismo complejo formado por muchos sistemas de órganos integrados. El objetivo de la Biología del desarrollo es desentrañar los misteriosos y fascinantes procesos que conducen a la transformación de un óvulo fecundado en un adulto. Puesto que conocemos mejor los procesos de desarrollo en los sistemas animales, la mayor parte de este Capítulo se centrará en estos organismos.

Los diferentes tipos celulares del cuerpo se distinguen por la variedad y cantidad de proteínas que expresan, es decir, por el perfil proteico de la célula (el conjunto de proteínas que contiene, descritas cuantitativa y cualitativamente). El perfil proteico de una célula de un organismo multicelular es el resultado final de una serie de decisiones genéticas reguladoras que determinan «cuándo, dónde y cuánta» expresión génica se produce. Así, para un gen concreto, nos interesa saber en qué tejidos y en qué momentos del desarrollo se transcribe, y qué cantidad de producto génico se sintetiza. Desde el punto de vista del genetista, todo el programa de desarrollo que controla cada perfil proteico del organismo, está determinado por la información reguladora cifrada en el DNA. Así, podemos considerar el genoma como una lista de todos los productos génicos (RNA y polipéptidos) que pueden ser generados, y el manual de instrucciones sobre cuándo, dónde y en qué cantidad deben sintetizarse estos productos. Por tanto, un aspecto de la Genética del desarrollo es la comprensión de cómo opera ese manual de instrucciones para dirigir a las células hacia distintas rutas de desarrollo, que generarán finalmente una gran constelación de tipos celulares característicos.

No es eso, sin embargo, todo cuanto queremos comprender sobre la Genética del desarrollo y sobre la generación de la diversidad celular. Queremos saber también cómo acaban integrándose todos estos tipos celulares en una distribución constructiva y coherente; en otras palabras, cómo acaban organizándose en tejidos y en órganos, y cómo estos sistemas de órganos y tejidos conforman a su vez un organismo individual integrado que funciona coherentemente.

Principios básicos de la Genética del desarrollo

El plan corporal básico no sólo es común a todos los miembros de una especie, ya que, en realidad, también es común a muchas especies distintas. Todas las especies de mamíferos tienen cuatro extremidades, mientras que todos los insectos tienen seis. Aun así, a lo largo de su desarrollo, todos los mamíferos e insectos deben diferenciar una parte anterior de una parte posterior, y un lado dorsal de uno ventral. Ojos y patas aparecen siempre en los lugares apropiados. Excepto cuando ocurren perturbaciones importantes que alteren el desarrollo, el plan corporal básico de una especie parece bastante inmune a los cambios ambientales. El estudio del desarrollo básico del plan corporal puede llevarse a cabo, por tanto, analizando el programa genético del organismo, sin tener en cuenta el medio ambiente. Sin embargo, no debemos olvidar que el estudio de la determinación genética de estos procesos básicos del desarrollo no nos permite explicar las diferencias fenotípicas entre los miembros individuales de una especie. Este capítulo se centra en los procesos que dirigen la formación de patrones, la construcción de una morfología compleja y cómo tales procesos operan de forma fiable para ejecutar el programa de desarrollo del plan corporal básico.

La lógica de la construcción del plan corporal

Durante la generación del plan corporal, las células quedan comprometidas a adoptar **destinos celulares** específicos, es decir, a diferenciarse en tipos celulares concretos. El destino celular al que se comprometen debe estar relacionado con la posición de la célula, ya que todos los órganos y tejidos están compuestos por muchas células, y la estructura completa de éstos requiere una división cooperativa del trabajo entre las células participantes. Así pues, se debe poder identificar de alguna manera la posición de las células y, de este modo, repartir la asignación de los distintos destinos entre un grupo de células colaboradoras o **campo de desarrollo.**

La información posicional se establece generalmente mediante señales proteicas emitidas por una fuente localizada dentro de una célula (el cigoto unicelular inicial) o dentro de un campo de desarrollo. Es el equivalente molecular al establecimiento de las reglas de las longitudes y latitudes geográficas. De igual forma que necesitamos longitudes y latitudes para navegar por el planeta, las células necesitan información para determinar su posición dentro de un campo de desarrollo y responder con la ejecución del programa apropiado. Una vez adquirida esa información posicional, normalmente se generan dentro del campo de desarrollo un número reducido de tipos celulares intermediarios. Mediante procesos adicionales de división celular y de toma de decisiones, se acabará estableciendo una población de células con la necesaria diversidad final de destinos.

Estos procesos adicionales —**especificación de destinos**— pueden ser de dos tipos. En unos casos, las células intermediarias se dividen de forma asimétrica, de modo que sus descendientes reciben distintas instrucciones reguladoras y, por tanto, se ven comprometidas a destinos distintos. Este puede considerarse como un mecanismo de reparto de destinos dependiente de linaje celular. En otros casos, las decisiones de desarrollo se toman «en comité», es decir, el destino de una célula depende del estímulo que recibe de células vecinas, y la respuesta que les da a través de mecanismos de señalización paracrinos (véase el Cap. 22). Estas decisiones dependientes del entorno celular son extraordinariamente importantes, porque el diálogo químico entre células asegura que todos los destinos han sido repartidos adecuadamente y que el patrón del reparto resulta coherente. El mecanismo dependiente del entorno celular ofrece también cierta flexibilidad. Es necesario que los mecanismos de desarrollo sean flexibles, de manera que un organismo pueda compensar posibles accidentes, como la muerte de alguna célula. Si se pierden algunas células por muerte accidental, se interrumpe la comunicación intercelular paracrina, y las células vecinas supervivientes pueden ser reprogramadas para multiplicarse y dar instrucciones a un subgrupo de sus descendientes para que adopten los destinos de las células desaparecidas. En realidad, la re-

23

GENÉTICA DEL DESARROLLO





a mutación homeótica que altera el plan corporal ico de *Drosophila*.

enomina homeosis a la sustitución de una parte del cuerpo por . En lugar de las antenas normales (parte superior), la mutación *nnapedia* provoca que las células precursoras de la antena se rollen como patas. *(F. R. Turner/BPS)*

Ideas fundamentales

En los organismos superiores, el genoma contiene una serie programada de instrucciones que establece los destinos de desarrollo de las células en relación con los rasgos fundamentales del plan corporal básico.

Las rutas de desarrollo se establecen mediante la ejecución secuencial de varias decisiones reguladoras.

El cigoto es totipotente, y da lugar a todos los tipos celulares del organismo adulto; conforme progresa el desarrollo, sucesivas decisiones van restringiendo cada línea celular a su destino particular.

La polaridad a lo largo de los ejes corporales fundamentales en el óvulo fecundado se establece mediante gradientes de proteínas reguladoras de origen materno; estas proteínas controlan la activación local de la transcripción en el cigoto de genes que cifran proteínas reguladoras «maestras».

Muchas proteínas que actúan como reguladores maestros del desarrollo temprano son factores de transcripción; otras son componentes de rutas de señalización intercelular.

Algunas células individuales deciden de forma autónoma su destino de desarrollo; aunque otras muchas decisiones sobre el destino celular requieren comunicación y colaboración entre varias células.

El mismo conjunto básico de genes identificados en *Drosophila*, y las proteínas reguladoras que cifran, están conservados en mamíferos y parecen gobernar importantes procesos de desarrollo en muchos o quizá todos los animales superiores.

generación de extremidades seccionadas que ocurre en algunos animales es una manifestación del poder de la especificación frente a la determinación rígida en la generación de patrones.

COROLARIO

Las células de un campo de desarrollo deben ser capaces de identificar sus posiciones geográficas y tomar decisiones de desarrollo en el contexto de las decisiones tomadas por sus vecinas.

La consecuencia del escenario descrito para el desarrollo es que el proceso de la determinación de un destino particular es gradual. Una célula no pasa de golpe de no estar comprometida en absoluto (de ser **totipotente**) a estar determinada irreversiblemente a un destino único. Cada decisión importante en la generación de patrones es, en realidad, un proceso en el que múltiples células que se encuentran en un mismo grado de compromiso van siendo asignadas, paso a paso, a destinos distintos. Normalmente, mientras se van produciendo tales sucesos, también se produce la proliferación celular. Así pues, si examinamos un **linaje celular** —esto es, el árbol familiar de una célula somática y sus descendientes— vemos que el grado de compromiso de las células parentales es menor que el de sus descendientes.

COROLARIO

Conforme se van multiplicando las células de un organismo en desarrollo, se toman decisiones que especifican de forma cada vez más y más precisa el destino que pueden adoptar las células de un linaje determinado.

Decisiones principales en la formación del embrión

En el embrión temprano se toman una variedad de decisiones de desarrollo para dar a las células sus identidades adecuadas y para generar el plan corporal. Algunas de ellas son decisiones binarias simples:

- Separación de la línea germinal (células formadoras de gametos) del soma (todas las demás).
- Establecimiento del sexo del organismo. (Normalmente todas las células del cuerpo realizan la misma elección).

Estas decisiones binarias suelen tomarse en una única fase del desarrollo y, como veremos más adelante, son ejemplos de determinación de destino irreversible.

Otras decisiones fundamentales implican múltiples opciones de destino y rutas de toma de decisión mucho más complejas, conduciendo a la aparición de los complejos patrones que componen el plan corporal, formados casi enteramente de células somáticas. La mayoría de estas decisiones son tomadas por poblaciones celulares locales:

- Establecimiento de la información posicional necesaria para orientar y organizar los dos ejes corporales principales del embrión: anteroposterior (de cabeza a cola) y dorso-ventral (de dorso a vientre).
- Subdivisión del eje anteroposterior del embrión en una serie de unidades distintas denominadas **segmentos** o metámeros, y asignación de distintas funciones a cada segmento, de acuerdo con su posición en el animal en desarrollo.
- Subdivisión del eje dorsoventral en las capas celulares externa, media e interna, denominadas **capas germinales**, y asignación de distintas funciones a cada una de ellas.
- Generación de varios órganos, tejidos, sistemas y apéndices del cuerpo mediante la acción coordinada y cooperativa de grupos localizados de células con origen en segmentos y capas germinales característicos.

COROLARIO

Entre las decisiones de desarrollo, las más simples suelen implicar compromisos irreversibles a una de dos opciones, mientras que las más complejas implican seleccionar entre múltiples opciones.

Aplicación de mecanismos reguladores a las decisiones del desarrollo

En el Capítulo 11, vimos cómo la regulación transcripcional de las rutas bioquímicas controla la producción de proteínas concretas en el momento y lugar adecuados, así como en la cantidad correcta. Normalmente, en una ruta bioquímica, el «interruptor» regulador que activa o bloquea la síntesis de las enzimas de esa

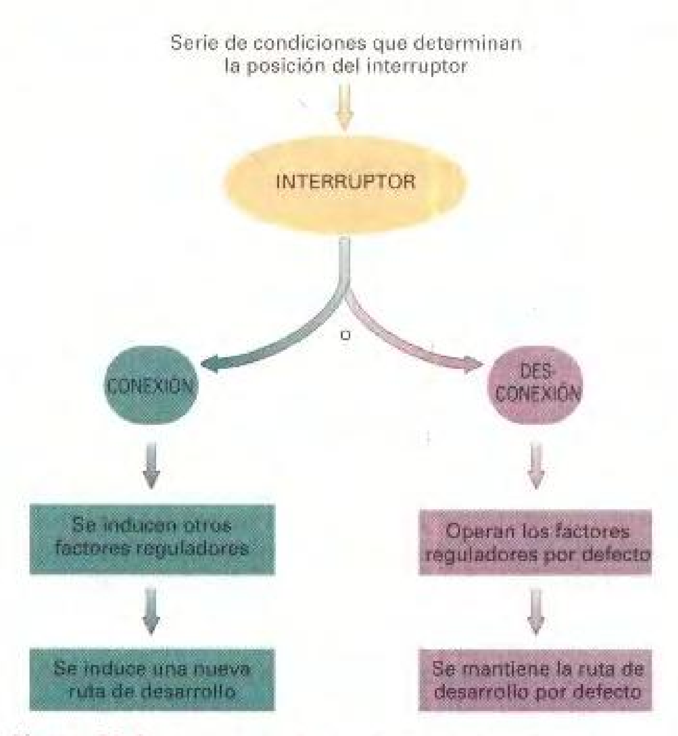


Figura 23-1. Toma de decisiones en las rutas de desarrollo. En los procesos de desarrollo, las células deben adoptar distintos papeles mediante una serie de decisiones binarias (conexión-desconexión). Las condiciones intracelulares regulan un interruptor maestro que, cuando se activa, inicia una cascada de procesos reguladores que, finalmente, conducen a la célula hacia una nueva ruta de desarrollo. Si la activación del interruptor maestro no se produce, una serie de señales ya presentes mantiene a la célula en la ruta por defecto.

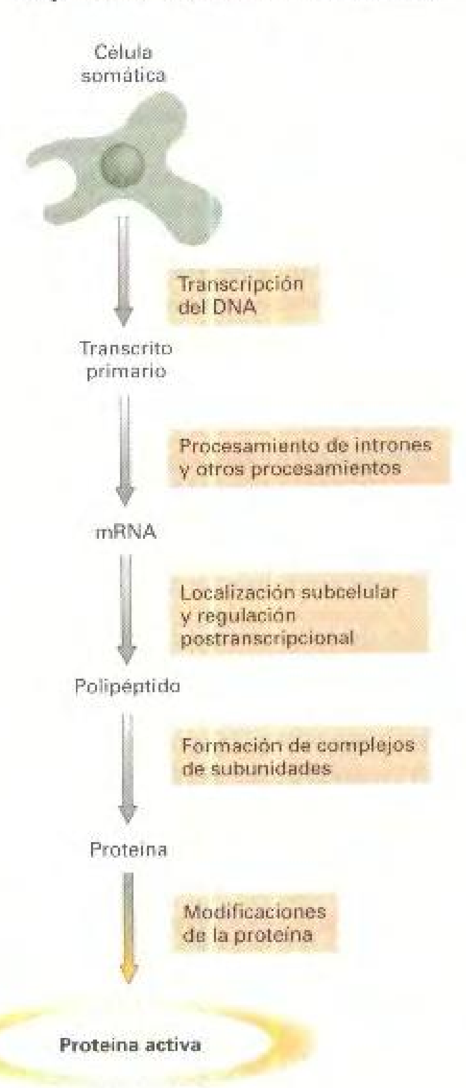


Figura 23-2. Regulación de la actividad de una proteína. Dentro de la célula, existen varios pasos de transmisión de información entre un gen y la proteína activa que cifra. Durante los procesos de desarrollo, la producción de proteína activa puede controlarse por la acción de mecanismos reguladores en cualquiera de estos pasos.

ruta es algún nutriente suministrado externamente al organismo. En una ruta de desarrollo, por el contrario, el interruptor regulador depende de alguna molécula clave producida por el propio organismo, bien una molécula sintetizada en la propia célula que toma la decisión o bien una molécula producida por otras células. Si se trata de una ruta de desarrollo sencilla, la concentración de dicha molécula determinará si se toma una u otra de las opciones del sistema binario (Fig. 23-1). Por encima de una cierta concentración umbral, se tomará una decisión; por debajo de ese umbral, se tomará la decisión contraria. Una de las decisiones «desconecta» la ruta y supone que el desarrollo prosigue por la misma vía programada en decisiones previas en la historia de esa célula; usualmente, esa vía se denomina *ruta por defecto*. La decisión de «conectar» desvía a la célula por una ruta alternativa.

Muchas rutas incluyen un mecanismo de mantenimiento que asegura que la decisión de conectar o desconectar permanezca bloqueada en esa posición. Tomar la decisión de seguir una ruta y recordar después esa decisión son dos aspectos fundamentales para determinar el destino celular.

Cuando diseccionamos una ruta de desarrollo, observamos que sus decisiones reguladoras pueden situarse en cualquiera de los niveles del proceso de transmisión de información del gen a la proteína activa (Fig. 23-2). En este capítulo, encontraremos casos que van desde la regulación de la transcripción hasta la modificación de proteínas o la interacción entre subunidades proteicas como forma de controlar el patrón de proteínas activas presentes en una célula.

La regulación de un gen no sólo afecta a la iniciación de la transcripción: algunos ejemplos

Regulación de la estructura del DNA en tejidos específicos

Durante muchos años se pensó que la estructura del DNA de las células somáticas y de la línea germinal era la misma. Ésto es básicamente cierto para la mayor parte del DNA de la célula aunque se han encontrado algunas excepciones importantes en las células somáticas de los organismos superiores. Dado que estas células somáticas nunca transmitirán su material genético a la descendencia, ha sido posible desarrollar mecanismos reguladores que alteran la estructura del DNA en estas células completamente diferenciadas sin modificar la organización de los genes de la línea germinal.

Vamos a analizar un ejemplo de reorganización de genes con consecuencias reguladoras importantes. En este caso, la amplifi-

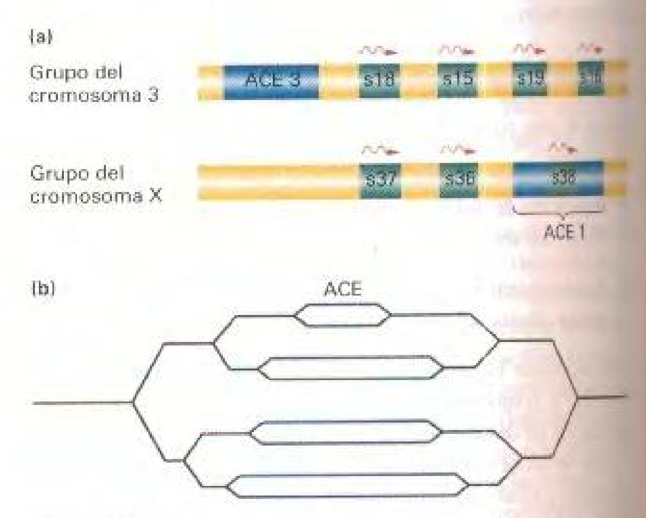


Figura 23-3. Estructura de las dos agrupaciones de genes de la cubierta del oocito en *Drosophila melanogaster*. (a) El grupo del cromosoma 3 contiene cuatro genes, y el del cromosoma X, tres. Cada grupo mide sólo unas 10 kb. Cada región ACE contiene un elemento de control de la amplificación. Parece que esta región funciona como un sitio especial para la iniciación de la replicación del DNA específicamente en las células del folículo del ovario. (b) Modelo que explica cómo podría tener lugar la amplificación mediante la iniciación múltiple de la replicación del DNA en un ACE. Cada línea representa una doble hélice de DNA. (Adaptado de T. Orr-Weaver, «Drosophila Chorion Genes: Cracking the Eggshell's Secrets». *Bioessays* 13, 1991, 97.)

cación del número de copias de un gen en un tejido concreto produce unos altos niveles de expresión del gen en dicho tejido.

En *Drosophila*, la producción de oocitos (oogénesis) tiene lugar en el ovario de la hembra adulta. Durante este proceso, deben generarse tanto el oocito maduro como una cubierta de naturaleza proteica. Las células del folículo, células somáticas que rodean cada oocito, se enfrentan a la tarea de tener que fabricar la cubierta del oocito muy rápidamente y, por lo tanto, deben sintetizar grandes cantidades de la proteína correspondiente en un tiempo mínimo. *Drosophila* ha encontrado una elegante solución a este problema: reorganizar el DNA específicamente en las células foliculares, de modo que aumente el número de copias de los genes implicados en la formación de la cubierta del oocito. En la mayoría de las células de *Drosophila*, sólo hay siete genes principales implicados en la formación de esta cubierta. Durante el desarrollo de las células foliculares, mediante un mecanismo de replicación especial (Fig. 23-3), los genes de la cubierta se amplifican entre 20 y 80 veces en dichas células, justo antes de que su transcripción sea necesaria. Así, en *Drosophila*, existen muchos más moldes de los genes de la cubierta del oocito sólo en las células foliculares: allí donde se necesitan y en el momento adecuado. Podemos ver fácilmente que esta amplificación específica es mucho más eficaz que mantener un alto número de copias en todas las células del cuerpo.

COROLARIO

Se pueden utilizar cambios en la estructura o el número de copias de un gen para regular la actividad de dicho gen de forma específica en un tejido.

Regulación específica en un tejido del procesamiento de transcritos

Los transcritos de la mayoría de los genes de los eucariotas superiores se procesan hasta dar lugar al mRNA maduro. La regulación del procesamiento del mRNA puede representar un importante punto de control en el desarrollo. Un ejemplo muy ilustrativo es la regulación del **elemento *P***, un elemento transponible (Fig. 23-4). Tal como vimos en el Capítulo 20, el elemento *P* es, en realidad, una familia de secuencias de DNA similares que encontramos en muchas estirpes de *Drosophila melanogaster*.

El elemento *P* intacto consiste en un fragmento de 3 kb que cifra su propia transposasa, un enzima que cataliza la transposición del elemento de un sitio a otro del genoma. En estirpes portadoras del elemento *P*, la transposición sólo se produce en la línea germinal, y no en las células somáticas, ya que la transposasa únicamente se encuentra en la línea germinal. Sin embargo, la transcripción del elemento *P* se produce en todas las células. ¿Cómo podemos explicar que aunque el elemento se exprese en todas partes sólo encontremos actividad transposasa en la línea germinal? El procesamiento de la transposasa es diferente en células somáticas y en las germinales. El mRNA de la transposasa P en la línea germinal contiene cuatro exones: 0, 1, 2 y 3 (Fig. 23-4). Frank Laski, Don Rio y Gerry Rubin propusieron una hipótesis: en las células somáticas, el mRNA de la transposasa P retendría el intrón situado entre los exones 2 y 3, es decir, este intrón no se procesaría durante la maduración del transcrito en las células somáticas. Un codón de parada presente en este intrón produciría una transposasa P somática que prácticamente sólo comprendería las secuencias proteicas cifradas en los exones 0, 1 y 2, y que, en consecuencia, carecería de todo el dominio carboxilo-terminal normal y de actividad. Para poner a prueba esta hipótesis, Laski, Rio y Rubin generaron un elemento *P in vitro* eliminando el intrón en cuestión y transformaron moscas con esta construcción transgénica $P\{\Delta 2,3\}$. La presencia de clones de tejido mutante en moscas portadoras del elemento $P\{\Delta 2,3\}$ y de otro elemento *P* que contenía un marcador que se expresaba en tejido somático (en este caso, el ojo) consiguió probar su capacidad de inducir la transposición de otros elementos *P* en células somáticas (Fig. 23-5), confirmando la idea de que la especificidad de la actividad de la trasposasa P en la línea germinal se debía a la regulación del procesamiento del transcrito.

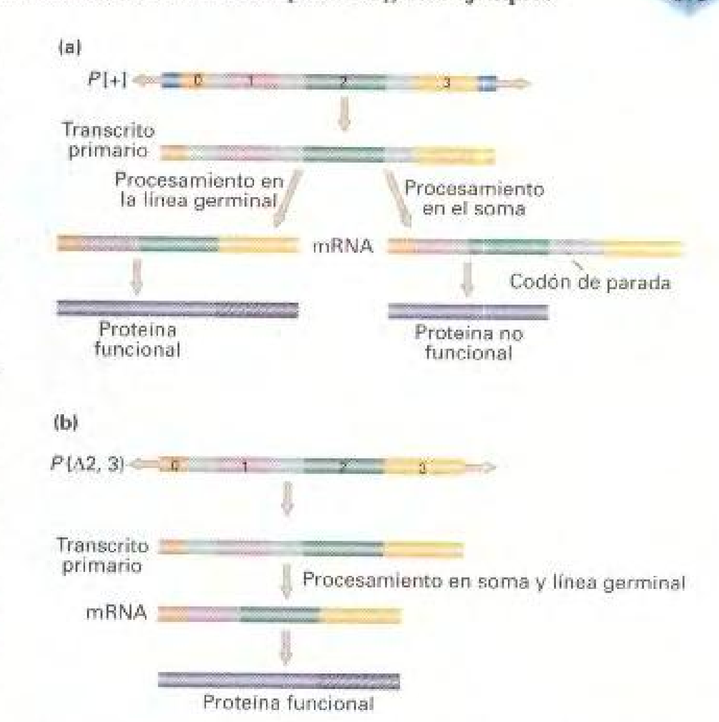
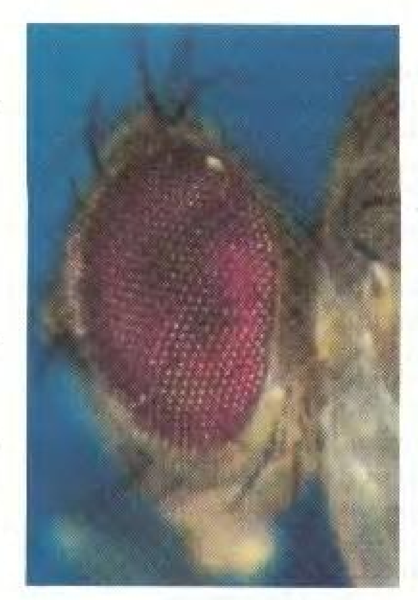


Figura 23-4. Expresión específica en la línea germinal de los elementos *P* de *Drosophila*: un ejemplo de regulación específica de tejido del procesamiento del RNA. (a) Estructura del mRNA del elemento *P* silvestre en la línea germinal y la somática. El mRNA de la línea germinal se forma mediante el procesamiento de cuatro exones (numerados del 0 al 3) y cifra la transposasa P. El mRNA somático mantiene el intrón situado entre los exones 2 y 3, que no ha sido procesado. Dado que este intrón contiene un codón de parada, la proteína resultante es más corta y carece de actividad transposasa. (b) Un transgén con un elemento *P* modificado, $P\{\Delta 2,3\}$, que carece del intrón situado entre los exones 2 y 3. En todos los tejidos, $P\{\Delta 2,3\}$ da lugar a un mRNA idéntico al silvestre, que confiere actividad transposasa tanto a la línea germinal como al soma.

COROLARIO

La producción de una proteína activa puede regularse controlando el patrón de procesamiento del transcrito inicial para generar el mRNA.





(a) (b)

Figura 23-5. Expresión somática de la transposasa P en *Drosophila*. Ambos paneles muestran moscas portadoras de una fuente de actividad transposasa P y de un segundo elemento *P* que carece de actividad, pero es susceptible de transponerse por la actividad transposasa P presente en el primer elemento. El segundo elemento *P* está marcado con el alelo w^+, que confiere color rojo a los ojos. Los alelos mutantes *white* habituales en *Drosophila* corresponden a mutaciones nulas en el gen *w*, por lo que la pigmentación del ojo depende de la presencia del transposón $P[w^+]$. (a) La transposasa P procede de un elemento *P* silvestre (véase la Fig. 23-4*a*). El ojo, en este caso, presenta una coloración roja homogénea. La ausencia de tejido blanco en el ojo indica que el elemento *P* es inactivo en el soma, es decir, que el mRNA de la transposasa silvestre fue procesado de modo que se sintetizó la forma inactiva del enzima. (b) En este caso, la transposasa proviene del transgén $P[\Delta 2,3]$. Los ojos están formados por sectores de tejido blanco y rojo. Los sectores blancos corresponden a tejido en el que el elemento $P[w^+]$ ha «saltado» del cromosoma, indicando que la transposasa P era activa en esas células somáticas. (Por cortesía de S. Misra y G. Rubin, University of California, Berkeley.)

Regulación postranscripcional

Una gran variedad de mecanismos modulan la traducción de los mRNA. Muchos de estos mecanismos actúan a través de las interacciones de moléculas reguladoras con el extremo 3' de los transcritos. Un mRNA puede dividirse en tres partes: una región 5' que no se traduce (5' UTR, del inglés *5' UnTranslated Region*), la región que cifra el polipéptido, a menudo denominada tramo de lectura abierta (ORF, del inglés *Open Reading Frame*), y otra región 3' que no se traduce (3' UTR). Ciertas secuencias que se encuentran en algunas 3' UTR provocan que el mRNA se degrade rápidamente. En otros casos, secuencias determinadas de la 3' UTR no provocarán la degradación del mRNA, sino bajos niveles de traducción. Se han identificado este tipo de secuencias en las 3' UTR de mRNA implicados en la determinación del sexo del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Las mutaciones en dichas secuencias conducen a la síntesis de las proteínas que cifran los mRNA en cantidades superiores a las normales. Se cree que estas secuencias representan sitios diana para proteínas que degradan el mRNA o que bloquean su traducción.

Recientemente, se ha descrito en *C. elegans* un nuevo tipo de interacción de secuencias en la 3' UTR con otras moléculas de RNA de función reguladora. Este fenómeno se descubrió estudiando mutantes heterocrónicos, es decir, mutantes en los que el avance temporal del desarrollo está alterado. En este nematodo, el gusano adulto se desarrolla después de pasar por cuatro estadios larvarios. Algunas mutaciones heterocrónicas provocan que el gusano adulto se desarrolle prematuramente, después de pasar por tan sólo tres estadios larvarios. Otras, retrasan el desarrollo del adulto, con la aparición frecuente de un quinto estadio larvario adicional. La base de estos fenotipos mutantes está en la alteración de la cronología normal de las divisiones de varios linajes celulares, de modo que no se producen determinadas divisiones celulares dentro de un linaje, dando lugar a un desarrollo prematuro, o se repiten anormalmente, causando el retraso de la progresión a la fase adulta. Dos de estos genes heterocrónicos son *lin-4* y *lin-14* (*lin* es una abreviatura del inglés *lineage defective*, linaje defectuoso). Se sabe que el producto del gen *lin-4* reprime la traducción del mRNA de *lin-14*. Se ha comprobado que la molécula represora que cifra el gen *lin-4* no es una proteína, sino un RNA que contiene secuencias complementarias a las encontradas en la 3' UTR del mRNA de *lin-14*. Se cree que esto conduce a la formación de un RNA bicatenario, mediante la interacción de la 3' UTR del mRNA de *lin-14* y la región complementaria del RNA *lin-4*, que reprime de algún modo la traducción de *lin-14*. Una 3' UTR puede contener también secuencias con capacidad de actuar como sitios de «amarre» del mRNA a estructuras determinadas dentro de la célula. Al localizar el mRNA en un sitio concreto de la célula, se pueden generar diferencias en la concentración de la proteína traducida dentro de la célula que pueden también afectar a su descendencia. Más adelante en este mismo capítulo, veremos cómo éste es uno de los mecanismos implicados en la formación de uno de los ejes corporales del embrión de *Drosophila*.

COROLARIO

Las instrucciones para la regulación del gen también pueden encontrarse en las regiones no traducidas de los mRNA.

Regulación postraduccional

Una vez que los polipéptidos se han sintetizado, todavía es posible modular su actividad mediante un gran número de mecanismos; y, de hecho, la regulación postraduccional tiene una gran importancia para la célula. La modificación enzimática de una

CUADRO 23-1. Comparación de las características de la determinación del sexo en *Drosophila* y mamíferos

Aspecto de la determinación del sexo	*Drosophila*	Mamíferos
Bases cromosómicas de XX frente a XY	Cociente X:A	Presencia o ausencia de Y
Bases moleculares de XX frente a XY	Interacción de las subunidades numerador: denominador de factores de transcripción	Gen del factor de transcripción determinante de la formación de testículos en el cromosoma Y
Proceso de toma de decisiones	Célula a célula	Los testículos actúan como fuente de instrucciones para formar órganos masculinos
Interruptor	Transcripción de *Sxl* (*Sex lethal*) en el embrión temprano	Presencia o ausencia del gen *SRY* (humanos) ~ *Sry* (ratón)
Nivel de la regulación aguas abajo	Procesamiento alternativo del mRNA	Transcripción
Desarrollo de mecanismos de autorregulación positiva	Bucle de autorregulación positiva de la proteína SXL sobre el procesamiento del mRNA *Sxl*	Presencia continua de los testículos
Establecimiento de expresión génica específica del sexo	Presencia de la forma específicamente masculina o femenina de la proteína cifrada en *dsx* (*doublesex*). Por lo general, DSX-F reprime genes específicamente masculinos y DSX-M reprime los femeninos. Para unos pocos genes, DSX-F ó DSX-M pueden actuar como activadores de la expresión de genes femeninos o masculinos.	Activación mediada por testosterona del receptor de andrógenos en los tejidos diana. El complejo receptor-testosterona regula la transcripción uniéndose a elementos de respuesta a andrógenos (intensificadores o silenciadores)

proteína puede cambiar su actividad biológica. Veremos ejemplos más adelante que muestran cómo la fosforilación de determinados aminoácidos puede producir dichos cambios. La interacción de diferentes polipéptidos para formar complejos proteicos multiméricos también puede tener efecto sobre la actividad de los componentes polipeptídicos. Por ejemplo, en la sección que trata de la ruta de determinación del sexo en *Drosophila*, veremos que la actividad de determinados factores de transcripción implicados está controlada mediante interacciones competitivas entre todas las posibles subunidades que pueden formar proteínas diméricas.

Decisiones de destino binarias: rutas de determinación del sexo

En muchas especies, la determinación del sexo va asociada a la transmisión de un par de cromosomas que será heteromórfico en uno de los sexos. Ello no significa, sin embargo, que todas esas especies hayan evolucionado a partir de un ancestro común que poseía tal dotación de cromosomas sexuales heteromórficos. Más bien, los mecanismos de determinación sexual XX-XY parecen haber surgido de forma independiente muchas veces en la evolución. Los cromosomas sexuales XX-XY de moscas y mamíferos aparecieron independientemente y, como veremos, los mecanismos que conducen a la determinación sexual de moscas y mamíferos son muy distintos. En el Cuadro 23-1 se comparan los aspectos fundamentales de los mecanismos de determinación sexual de estos dos tipos de organismos.

Tanto en las moscas como en los mamíferos, muchas áreas del cuerpo desarrollan características sexualmente dimórficas; esto es, tales áreas son diferentes en machos y hembras. En *Drosophila*, por ejemplo, los dos sexos difieren en la estructura

CUADRO 23-2. Efecto de la dosis de cromosomas sexuales en el fenotipo sexual somático en constituciones diploides de *Drosophila* y humanos

	FENOTIPO SEXUAL SOMÁTICO	
Cromosomas sexuales	*Drosophila*	Humanos
Euploidía		
XX	♀	♀
XY	♂	♂
Aneuploidía		
XXY	♀	♂
XO	♂	♀

de los propios órganos sexuales y en la pigmentación del abdomen. Los mecanismos de determinación sexual y cómo tales mecanismos aseguran la expresión de esas características sexualmente dimórficas serán el objeto principal de los siguientes apartados.

La determinación del sexo en *Drosophila*: cada célula decide individualmente

Cada linaje celular de *Drosophila* toma su propia decisión sexual. Una de las mejores maneras de demostrarlo es analizar moscas mosaico XX-XY, es decir, moscas individuales que contienen una mezcla de células XX y XY. Tales mosaicos manifiestan una mezcla de fenotipos, de acuerdo con el genotipo de cada célula individual. La interpretación de esta diferencia es que cada célula de *Drosophila* determina su sexo de forma independiente.



Figura 23-6. Ruta de la determinación y diferenciación del sexo en *Drosophila*. El cociente X:A se estima mediante la interacción de las subunidades proteicas monoméricas del numerador y del denominador que se unen para formar el complejo activo NUM-NUM, que actúa como factor de transcripción. Los niveles de este factor de transcripción numerador determinan si *Sxl* (*Sex lethal*) se mantendrá permanentemente activado o desactivado. En el primer caso, se pondrá en marcha la ruta de diferenciación sexual femenina que, finalmente, conduce al procesamiento del mRNA *dsx* (*doublesex*) en la forma que da lugar a un factor de transcripción que reprime los genes específicos del desarrollo masculino. Si *Sxl* es desactivado, la ruta de diferenciación sexual femenina no se pone en marcha y el modo de procesamiento por defecto de *dsx* produce un mRNA que corresponde a un factor de transcripción que actúa reprimiendo la expresión de genes femeninos.

Consecuencias fenotípicas de los diferentes cocientes entre el número de cromosomas X y el de autosomas

La base cromosómica de la determinación del sexo en *Drosophila* está en el cociente entre el número de cromosomas X y el de dotaciones de autosomas. Como ya vimos, en *Drosophila*, $n = 4$: un cromosoma sexual y tres autosomas distintos. Por tanto, una dotación autosómica, que representamos como A, comprende los tres autosomas distintos y, en una mosca diplode, A = 2. El efecto del cociente X:A es especialmente evidente cuando examinamos individuos aneuploides para cromosomas sexuales (Cuadro 23-2). Una mosca diploide 2X normal (XX AA) presenta un cociente X:A de 1.0 y es fenotípicamente hembra. Un diploide XY (XY AA) presenta un cociente X:A de 0.5 y es macho; un diploide XO también es macho, aunque estéril. Los triploides con tres cromosomas X (XXX AAA) son hembras, los que poseen uno sólo (XYY AAA) son machos, y aquellos con dos X (XXY AAA) están «en medio» (son intersexos).

Aspectos básicos de la ruta reguladora

Veamos primero un esquema general de la ruta (Fig. 23-6). En el embrión temprano, el cociente X:A determina si una mosca será macho o hembra. La orden que establece el fenotipo sexual se establece mediante un interruptor regulador maestro y varios genes específicos de sexo que actúan a continuación. Si el interruptor permanece desconectado se ejecuta la ruta de determinación del sexo masculino, mientras que su conexión desvía a las células al modo de determinación sexual femenino. La ruta se inicia mediante transcripción diferencial, se mantiene la posición del interruptor y la decisión se propaga mediante procesamiento diferencial del RNA. El modo por defecto de la ruta resulta en la producción de factores de transcripción específicos del macho, mientras que la ruta alternativa da lugar a la producción de factores de transcripción específicos de la hembra.

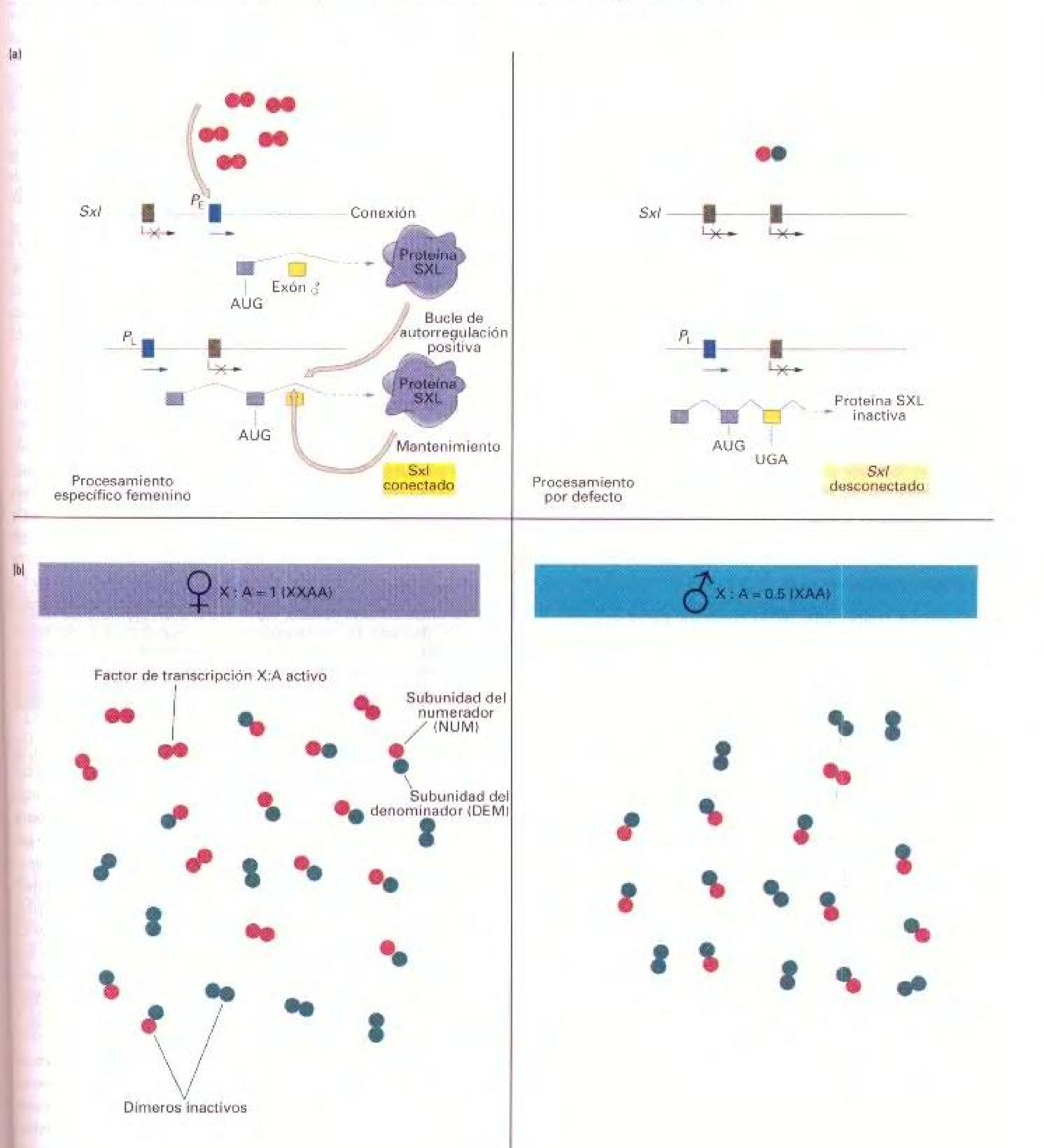
El interruptor regulador

Mediante estudios genéticos, sabemos que la actividad de un gen denominado *Sxl* (*Sex lethal*) funciona como el interruptor regulador de este proceso. En una mosca en la que el cociente X:A es 1.0, se sintetiza la proteína SXL y la mosca se desarrolla como hembra. En una mosca cuyo cociente X:A es 0.5, no se produce proteína SXL funcional y, en consecuencia, la mosca se desarrolla como macho.

Cómo se conecta o desconecta el interruptor. El cociente X:A pone en marcha la ruta de determinación del sexo por la interacción de los productos proteicos de una serie de genes del

Figura 23-7. Conexión y mantenimiento del interruptor *Sxl*. (a) Interruptor *Sxl*. Cuando se encuentran a niveles altos, los dímeros NUM-NUM activan la transcripción a partir del promotor temprano de *Sxl* (P_E). (Los promotores activos se representan con rectángulos azules, los inactivos con rectángulos verdes). Hacia la mitad de la embriogénesis, P_E se inactiva y *Sxl* se transcribe en todas las células del animal a partir del promotor tardío constitutivo (P_L). La proteína SXL activa preexistente se une al transcrito primario producido a partir de P_L y regula su procesamiento (impidiendo que el exón masculino se mantenga en el mRNA final). De este modo, se asegura que continúe la producción de proteína SXL activa que, a su vez, mantiene el patrón de procesamiento necesario para su propia producción, creando así un bucle de autorregulación. Por otro lado, cuando el cociente X:A es 0.5, P_E no se activa, no hay proteína SXL en el embrión temprano y el patrón de procesamiento del transcrito derivado de P_L genera un mRNA que incluye el exón masculino. Este exón contiene un codón de parada (UGA), que produce la terminación prematura del polipéptido SXL. (b) Un mecanismo molecular plausible que explicaría los efectos del cociente X:A. Durante la embriogénesis temprana, se expresan los genes del numerador y del denominador. Se forman dímeros al azar entre las subunidades polipeptídicas NUM (círculos rojos), cifradas por genes del cromosoma X, y las subunidades DEM (círculos verdes), cifradas por genes autosómicos. Sólo los dímeros NUM-NUM funcionan como factores de transcripción activos. Si el cociente X:A es 1.0, se forman dímeros NUM-NUM en grandes cantidades que al unirse al intensificador de P_E, activan la transcripción de *Sxl*. Sin embargo, cuando el cociente X:A es 0.5, la mayoría de las subunidades NUM forman parte de dímeros NUM-DEM y no funcionan como factores de transcripción activos.

cromosoma X, de expresión cigótica, que denominamos *del numerador*, y los de una serie de genes autosómicos que se expresan maternal y cigóticamente, los genes *del denominador*. Al menos algunos de los genes del numerador y del denominador cifran factores de transcripción de tipo **proteínas básicas hélice-lazo-hélice (bHLH)**. Se sabe que las proteínas bHLH sólo son funcionales como factores de transcripción cuando dos monómeros bHLH se asocian en una proteína dimérica. En esta sección, utilizaremos el término NUM para designar a las proteínas bHLH del numerador, cifradas por el cromosoma X, y el término DEM para designar a las proteínas bHLH del denominador, cifradas por autosomas.



Estos factores de transcripción tienen una única función: en un pequeño intervalo de tiempo durante el desarrollo temprano del embrión de *Drosophila* —de 2 a 3 horas después de la fecundación— determinan si se enciende o no el interruptor regulador *Sxl*. El gen *Sxl* funciona básicamente como un botón, un interruptor que queda permanentemente en posición de «conectado» en hembras y de «desconectado» en machos (Fig. 23-7*a*). Para conectar el interruptor *Sxl*, el nivel de los factores de transcripción NUM debe ser alto (debido a que X:A = 1.0). A niveles altos (femeninos), los factores de trancripción NUM presentes en el embrión temprano se unen a intensificadores del gen *Sxl*, activando su transcripción a partir del promotor temprano de dicho gen. El transcrito generado por ese promotor temprano produce entonces proteína SXL activa.

Por el contrario, cuando los niveles de los factores NUM son bajos, como ocurre cuando el cociente X:A es 0.5, no hay suficiente cantidad de estos factores de transcripción para que se exprese *Sxl* y no se produce proteína SXL activa.

Con toda probabilidad, las proteínas NUM miden el cociente X:A compitiendo con las proteínas DEM en la formación de dímeros (Fig. 23-7*b*). Aunque no sabemos con certeza cómo funciona este sistema, un mecanismo plausible sería el siguiente:

- Los monómeros NUM poseen un sitio de unión a DNA de secuencia específica, mientras que las proteínas DEM carecen de ese sitio de unión a DNA.
- El sitio de unión a DNA de NUM reconoce la secuencia de un intensificador que regula la actividad del promotor temprano del gen regulador *Sxl*. Como veremos en la sección siguiente, la transcripción a partir de ese promotor es necesaria para el establecimiento de la expresión génica de *Sxl* en el embrión temprano.
- Tanto los polipéptidos NUM como los DEM se sintetizan a niveles proporcionales al número de copias de cada gen bHLH del numerador o del denominador presente en la célula. De este modo, los embriones cuyo cociente X:A es 1.0 tienen dos veces más polipéptidos NUM por célula que los embriones cuyo cociente X:A es 0.5. Por el contrario, ambos poseen los mismos niveles de DEM, con independencia del cociente X:A.
- Pueden formarse dímeros en cualquier combinación: homodímeros NUM-NUM, heterodímeros NUM-DEM y homodímeros DEM-DEM. Su proporción dependerá de las concentraciones relativas de monómeros NUM y DEM en una célula.
- Para que un factor de transcripción sea activo, es necesario que las dos subunidades del dímero bHLH posean sitios de unión a secuencias específicas de DNA. Esto sólo ocurre en los homodímeros NUM-NUM. Así pues, en cierto sentido, los monómeros DEM de los heterodímeros DEM-NUM actúan como inhibidores de la actividad de las subunidades NUM como factores de transcripción.

El resultado final de este escenario es que cuanto mayor sea el cociente NUM:DEM más factores de transcripción activos NUM-NUM hay en la célula. Así, podemos esperar que un embrión temprano cuyo cociente X:A sea 1.0 acumule más factores de transcripción activos que un embrión cuyo X:A sea 0.5

COROLARIO

Las interacciones proteína-proteína, tales como la competición entre subunidades normales e inhibidoras para formar dímeros, pueden servir para controlar interruptores de desarrollo.

Cómo fijar el interruptor en una posición estable. El gen *Sxl* tiene dos promotores. El promotor temprano (P_E) es el único activado por los factores de transcripción NUM-NUM, y sólo opera en la fase inicial de la embriogénesis. En fases más avanzadas de este proceso, y durante el resto del ciclo vital, el gen *Sxl* se transcribe a partir del promotor tardío (P_L) independientemente del cociente X:A o de cualquier otra condición. Este promotor tardío es activo en todas las células del animal desde la fase intermedia del desarrollo embrionario y durante el resto de la vida del organismo. El transcrito primario que se produce a partir del promotor tardío es mucho mayor que el producido a partir del promotor temprano, y sufre un procesamiento alternativo del RNA que depende de la presencia previa o ausencia de la proteína SXL activa en la célula. La proteína SXL es una proteína de unión a RNA que modifica el procesamiento del transcrito naciente *Sxl* a partir del promotor tardío. Cuando el mRNA se procesa mientras está unido a la proteína SXL, se genera un mRNA que cifra nueva proteína activa SXL. Ésta se une a su vez a nuevos transcritos primarios *Sxl* procedentes del promotor tardío, generando la forma procesada del mRNA que cifra más proteína SXL funcional y así sucesivamente. De esta manera, un bucle de retroalimentación o autorregulación, controlado a nivel del procesamiento del RNA, mantiene la actividad SXL a lo largo del desarrollo de las moscas cuyo cociente X:A es 1.0

COROLARIO

El bucle autorregulador nos muestra un ejemplo de cómo una decisión temprana puede ser recordada durante todo el proceso de desarrollo, incluso mucho después de que hayan desaparecido las señales que dieron lugar a dicha decisión.

Por el contrario, si el cociente X:A es 0.5, el interruptor *Sxl* está desconectado. El promotor temprano no se activa en la fase inicial de la embriogénesis y, por tanto, el embrión temprano X:A = 0.5 carece de proteína SXL. En ausencia de SXL activa, el transcrito primario *Sxl* del promotor constitutivo tardío se procesa por la vía por defecto no regulada. El mRNA resultante no es funcional, ya que contiene un codón de parada poco después del codón de inicio de la traducción. La pequeña proteína que se produce mediante este procesamiento específico de machos carece de actividad biológica. Así pues, en moscas con un bajo nivel de factores de transcripción NUM-NUM activos, la ausencia de proteína SXL funcional en el desarrollo temprano determina que no haya SXL activa durante el resto del desarrollo.

Cómo propagar la decisión. SXL no sólo debe ejercer una función autorreguladora de mantenimiento, sino que debe ser capaz de activar una nueva ruta que conducirá a la expresión génica específica de hembras. Para ello, SXL utiliza la misma actividad de unión a RNA. El transcrito del gen *tra* (*transfor-*

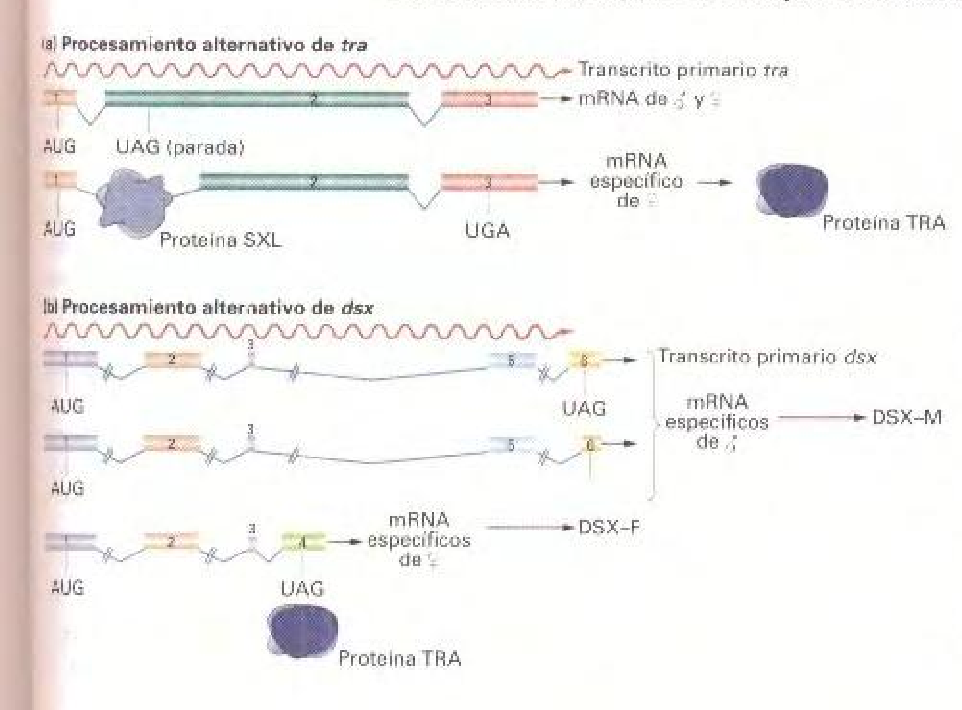


Figura 23-8. Procesamiento alternativo de los transcritos *tra* y *dsx*. (a) Se generan dos formas de mRNA *tra*. Una forma está presente en ambos sexos y, debido a que contiene un codón de parada (UAG) en el exón 2, no cifra una proteína funcional. La otra forma es específica de hembra y cifra el polipéptido TRA activo. (b) Cada sexo produce mRNA *dsx* diferentes. En machos, se encuentran dos tipos de mRNA específicos, que no incluyen el exón 4. Ambos cifran polipéptidos relacionados, DSX-M, que actúan reprimiendo la expresión de genes específicamente femeninos. En las hembras, el mRNA *dsx* no contiene los exones 5 y 6. El polipéptido DSX-F correspondiente reprime la transcripción de genes específicos de macho. (Adaptado de M. McKeown, «Sex Differentiation: The Role of Alternative Splicing». *Current Opinion in Genetics and Development* 2, 1992, 301.)

mer) sólo se procesa de manera adecuada en presencia de la proteína SXL, produciendo el mRNA correspondiente a la proteína TRA activa (Fig. 23-8*a*). La proteína TRA es, a su vez, otra proteína de unión a RNA que provoca un procesamiento específico de hembra del RNA naciente del gen *dsx* (*doublesex*). Este último mRNA, así generado, cifra la proteína DSX-F, un factor de transcripción que reprime de forma general la expresión de genes específica de machos (Fig. 23-8*b*).

En ausencia de proteína SXL activa, el modo de procesamiento del transcrito primario del gen *tra* genera un mensajero que no produce proteína TRA funcional. En ausencia de proteína TRA activa, el procesamiento del transcrito primario del gen *dsx* lleva a la producción de DSX-M, un factor de transcripción que reprime la expresión génica específica de hembra.

En el siguiente apartado se describe cómo ha contribuido el análisis genético al conocimiento de la determinación del sexo en *Drosophila*.

Análisis mutacional de la determinación del sexo en *Drosophila*

De Thomas Hunt Morgan, el padre fundador de la Genética en *Drosophila*, se cita la frase: «Atesora las rarezas que encuentres». Éste ha sido el principio que ha guiado el análisis genético de cualquier proceso biológico durante el siglo XX. Tal estrategia, el estudio de las propiedades de organismos individuales mutantes raros y el uso de estas observaciones para inferir qué está pasando en el proceso normal, ha ampliado extraordinariamente nuestra comprensión de la determinación del sexo en varias especies de grupos taxonómicos muy distintos.

Los conocimientos que tenemos sobre la determinación del sexo en *Drosophila* han surgido del análisis genético y molecular de mutaciones que alteran el fenotipo sexual de la mosca, llevado a cabo, sobre todo, por Thomas Cline, Bruce Baker y sus colaboradores. ¿Qué tipo de mutaciones encontraron? En cuanto a fenotipos sexuales dimórficos, encontraron que el efecto de mutaciones nulas en varios genes de la ruta era la transformación de hembras en machos fenotípicos, mientras que los machos homocigóticos para esas mismas mutaciones eran completamente normales. Entre esos genes mutados se encontraban *sis-b* (*sisterless-b*), *Sxl* (*Sex lethal*) y *tra* (*transformer*). En machos eran prescindibles, porque la ruta de desarrollo masculina parece derivar de la posición por defecto del interruptor regulador. En otras palabras, la ruta de determinación del sexo de *Drosophila* necesita las actividades de varios productos génicos para desviar al animal de la ruta por defecto a la ruta de desarrollo femenina. El gen *sis-b*, un gen del numerador que cifra un proteína bHLH, debe ser funcional para conseguir un cociente efectivo X:A de 1.0, y también son necesarias las formas activas de los reguladores del procesamiento del mRNA —las proteínas de unión a RNA cifradas en los genes *Sxl* y *tra*— para que prosiga el desarrollo femenino. En machos, todos esos genes están desconectados, así que las mutaciones que destruyen su función no tienen consecuencia alguna para el desarrollo del macho.

La excepción es el gen *dsx* (*doublesex*). Su inactivación provoca la aparición de moscas que muestran simultáneamente caracteres masculinos y femeninos. La razón de este fenotipo es que cada una de las dos proteínas DSX alternativas, DSX-F y DSX-M, reprimen genes cuyos productos generan las estructuras típicas del sexo opuesto. Cuando no existe ninguna represión, estos productos génicos específicos de cada uno de los sexos se expresan simultáneamente, desarrollándose una mosca que es, a la vez, macho y hembra.

(Un comentario al margen: Podríamos preguntarnos por qué *Sxl* se denomina *Sex-lethal*, letal, siendo el fenotipo sexual un carácter prescindible. La respuesta es que el fenómeno de compensación de dosis —la igualación de la expresión de los genes ligados al X de las hembras 2X con la de los machos 1X— tam-

bién se controla mediante la proporción NUM/DEM y por el gen *Sxl*, aunque no por los genes *tra* o *dsx*. Que no se produzca la adecuada compensación de dosis resulta letal. Se han utilizado trucos genéticos especiales para evitar este problema de letalidad y poder así estudiar los aspectos específicos de la acción de *Sxl* en la determinación del sexo).

Determinación del sexo en mamíferos: control coordinado por el sistema endocrino

El estudio de los aneuploides para cromosomas sexuales demuestra que la determinación y la diferenciación sexual de los mamíferos son bastante distintas de las de *Drosophila* (Cuadro 23-2). Una persona XXY es fenotípicamente un varón, con un síndrome de anormalidades moderadas (síndrome de Klinefelter, Fig. 18-20). Las personas XO manifiestan ciertas anormalidades (síndrome de Turner, Fig. 18-7), como una baja estatura, retraso mental y gónadas escasamente desarrolladas, pero su morfología es claramente femenina. Estos datos concuerdan con un mecanismo de determinación del sexo basado en la presencia o ausencia del cromosoma Y. Sin el Y, la persona se desarrolla como hembra; con él, como varón.

El desarrollo reproductivo de mamíferos y su control mediante órganos endocrinos

Al contrario que las moscas, cada célula individual humana no toma una decisión propia sobre su sexo. Las personas que son mosaicos de tejidos XX y XY manifiestan normalmente el aspecto característico de uno u otro sexo. La observación de esta falta de autonomía en la determinación del sexo en los mamíferos puede entenderse en función de la biología del sistema reproductor: los fenotipos característicos de sexo están dirigidos por la presencia o ausencia de los testículos.

Las gónadas humanas se forman en los dos primeros meses de la gestación. Las células primordiales de la línea germinal emigran a la cresta gonadal, situada sobre el riñón rudimentario. El cromosoma sexual de las células germinales determina si emigran superficial o profundamente en la cresta gonadal y se organizan como un testículo o un ovario (Fig. 23-9). Si forman un testículo, las células de Leydig de dichos testículos segregan testosterona, una hormona esteroide androgénica (formadora de varones). (Recordemos la discusión del Capítulo 11 sobre factores de transcripción que son receptores de hormonas esteroides). La testosterona se une a receptores de andrógenos. Estos receptores funcionan como factores de transcripción, pero para ser activos, necesitan unirse a la hormona correspondiente. Es, pues, el complejo receptor-andrógeno el que se une a elementos intensificadores de respuesta a andrógenos, lo cual conduce a la activación de la expresión de genes específicos del varón. En embriones que son genotípicamente hembras, no se forman células de Leydig en la gónada, por lo que no hay producción de testosterona, el receptor de andrógenos no se activa y el embrión continúa en la ruta por defecto femenina. Así pues, es la presencia o ausencia de testículos la que determina el fenotipo sexual, mediante la liberación endocrina de testosterona. En realidad, en embriones XY que

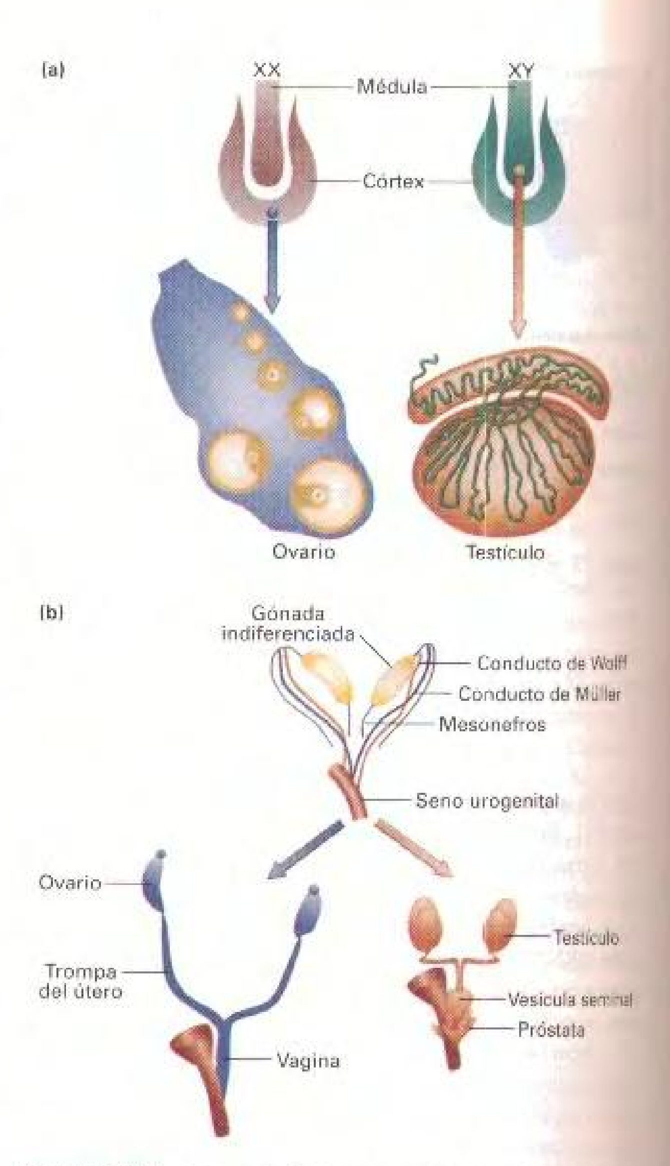


Figura 23-9. Desarrollo del sistema urogenital de mamíferos. (a) La cresta gonadal embrionaria consiste en una médula rodeada por un córtex. Las células germinales femeninas migran al córtex y forman el ovario. Las células germinales masculinas migran a la médula y forman los testículos. (b) En la estructura urogenital inicial, cuando las gónadas están aún indiferenciadas, están presentes tanto las células precursoras de los conductos masculinos (conductos de Wolff), como de los femeninos (conductos de Müller). Si se forma un testículo, éste segrega dos hormonas, la testosterona y una hormona polipeptídica conocida como «sustancia inhibidora de Müller» (MIS, u hormona antimülleriana). Estas hormonas provocan la degeneración de los conductos de Müller y que los conductos de Wolff se desarrollen como los conductos reproductores masculinos. Si se forma un ovario, no se produce testosterona ni MIS, y ocurre lo contrario: los conductos de Wolff degeneran y los conductos de Müller se desarrollan como conductos reproductores femeninos. (Adaptado de U. Mittwoch, *Genetics of Sex Differentiation*. © 1973 de Academic Press.)

carecen del receptor de andrógenos, se produce un desarrollo enteramente femenino, a pesar de que el embrión posea testículos.

Cómo conectar o desconectar el interruptor

¿Qué inicia la ruta de determinación del sexo? Los estudios genéticos y moleculares se han centrado en identificar el locus del

cromosoma Y responsable de la formación de los testículos. Este hipotético gen fue denominado «factor determinante de testículos del cromosoma Y» (*TDF* en la especie humana, *Tdy* en los ratones); hoy sabemos que se trata del gen también conocido como *SRY* (seres humanos) ~ *Sry* (ratones), identificado originalmente por su efecto dominante (de ganancia de función) de reversión del sexo en individuos heterocigóticos mutantes XX que se desarrollaban fenotípicamente como varones (véase la sección siguiente). Puesto que el gen silvestre *SRY* ~ *Sry* está en el cromosoma Y, podemos comprender fácilmente cómo se establece la posición del interruptor. El individuo normal XY posee un gen *SRY* ~ *Sry* que activa la ruta de desarrollo masculina, mientras que el individuo normal XX, que carece de *SRY* ~ *Sry*, permanece en la ruta por defecto femenina.

¿Cómo contribuye *SRY* ~ *Sry* a la determinación del sexo? La proteína SRY ~ *Sry* es un factor de transcripción que se expresa en la gónada rudimentaria masculina. No sabemos con certeza cómo la proteína SRY ~ *Sry* inicia la formación de los testículos. Sin embargo, ahora que se conoce la secuencia de la proteína SRY ~ *Sry* se nos abren muchas vías para responder a ésta y otras antiguas preguntas sobre las bases biológicas del fenotipo sexual.

Análisis mutacional de la determinación del sexo en mamíferos

El gen determinante de testículos del cromosoma Y fue identificado por Robin Lovell-Badge y Peter Goodfellow, mediante la cartografía y caracterización de un síndrome genético frecuente en ratones y humanos que casi con toda certeza estaba relacionado con dicho gen (véase el mapa molecular de la Fig. 23-10). El síndrome es conocido como **reversión sexual**.

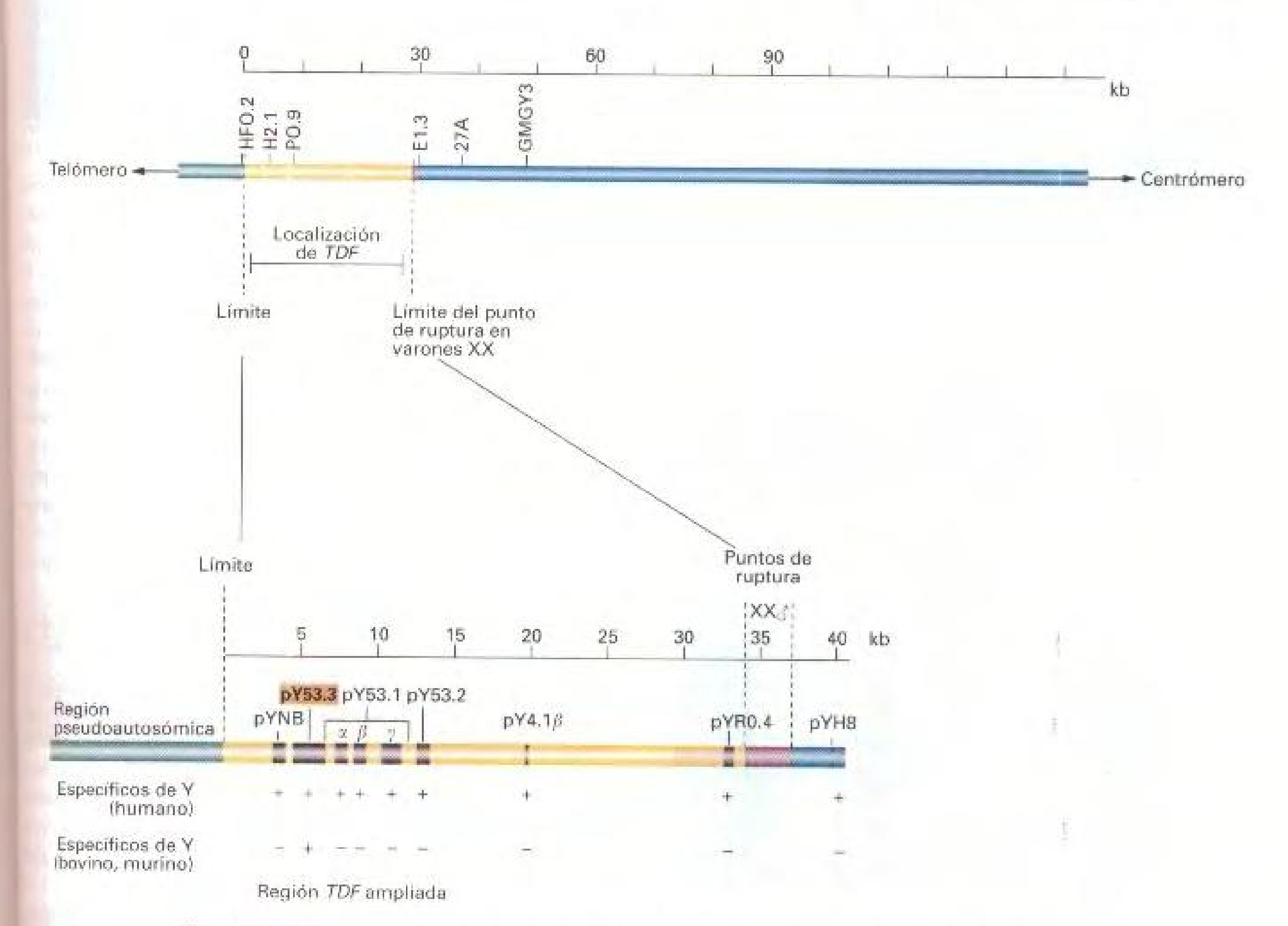
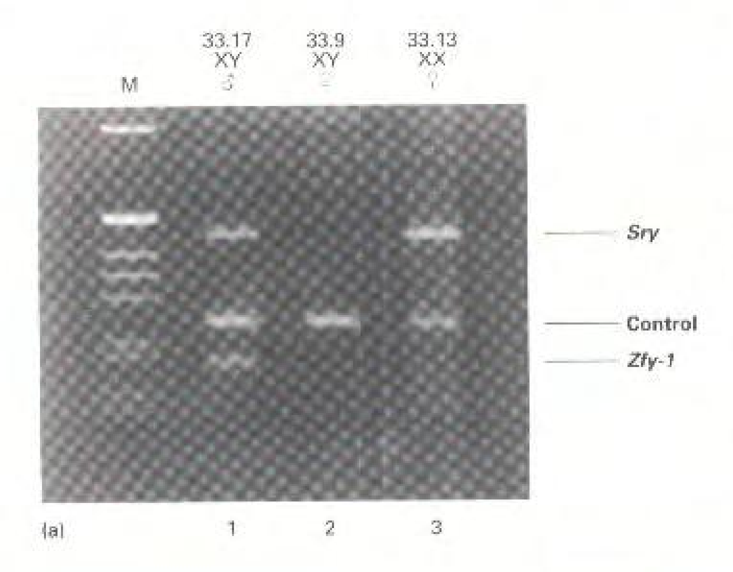


Figura 23-10. Mapa molecular de la región distal del brazo corto del cromosoma Y humano. El gen que cifra el factor determinante de testículos (*TDF*) fue localizado en una región de 34 kb siguiendo los razonamientos siguientes: a la izquierda de esta región, la secuencia del DNA es la misma en los cromosomas X e Y. (Estas secuencias consituyen la denominada *región pseudoautosómica*). Es suficiente un fragmento del cromosoma Y que vaya desde el telómero hasta la posición 34 (kb) del mapa para provocar el síndrome de reversión sexual. La mayor parte del DNA dentro de esta región está repetido muchas veces en otras partes del genoma, pero pueden identificarse ocho subregiones de DNA específicas del cromosoma Y (representadas en negro). Mediante experimentos de hibridación cruzada, se demostró que sólo una de estas regiones (la pY53.3) está presente también en cromosomas Y de bovinos y de ratón. Este fragmento contiene el gen *SRY*. Se han encontrado mutaciones puntuales en *SRY* en algunas personas que sufren reversión sexual (Adaptado de A.H. Sinclair *et al.* «A Gene from the Human Sex-Determining Region Encodes a Protein with Homology to a Conserved DNA-Binding Motif». *Nature* 346,1990,240.)

Los individuos XX que desarrollan este síndrome son fenotípicamente machos y se demostró que eran portadores de un fragmento del cromosoma Y en sus genomas. En general, estas duplicaciones del cromosoma Y se producen por un entrecruzamiento ilegítimo entre los cromosomas X e Y que añade un trozo de este último al extremo de uno de los cromosomas X. Se clonó la parte del cromosoma Y presente en estas alteraciones y, mediante análisis molecular, Lovell-Badge y Goodfellow identificaron un transcrito de esa región que se expresaba en la cresta gonadal.

El gen correspondiente se denominó *gen de la reversión del sexo del cromosoma Y* (*SRY* en humanos, *Sry* en ratones), dado que se identificó en base a ese síndrome, pero se trata en realidad del gen *TDY* ~ *Tdy*. Lovell-Badge y Goodfellow usaron un transgén para aportar una prueba espectacular de esta identidad (Fig. 23-11). Un fragmento clonado de 14 kb de DNA genómico, que contenía el gen *Sry*, fue insertado en el genoma del ratón mediante transformación de la línea germinal. Un descendiente XX que llevaba el inserto del DNA *Sry* (el transgén) mostraba un fenotipo completamente masculino, tanto en sus caracteres internos como externos; y, como se había predicho, presentaba tejidos somáticos testiculares, incluyendo las células de Leydig que producen testosterona. (Sin embargo, el ratón era estéril. Probablemente, esta esterilidad es consecuencia de la presencia de dos cromosomas X en las células sexuales masculinas, ya que los ratones machos XXY son igualmente estériles). Así pues, quedaba demostrado de forma directa que un solo factor genético alteraba drásticamente el fenotipo sexual en los mamíferos, un hecho perfectamente consistente con el papel de *SRY* ~ *Sry* como el gen que determina el desarrollo de los testículos.

El papel del receptor de andrógenos, recibir la señal de testosterona y establecer las características sexuales secundarias masculinas, se comprobó estudiando unos ratones raros (*Tfm*) que carecen de ese receptor. Los ratones XY hemicigóticos para la mutación ligada al X *Tfm* (*Testicular feminization*) se desarrollan fenotípicamente como hembras (Fig. 2-26), aunque son estériles y se diagnostican típicamente en la pubertad por la falta de menstruación. Los ratones *Tfm* XY tienen testículos, pero las células diana que deben decidir entre las rutas alternativas relacionadas con las características sexuales dimórficas carecen de receptores de andrógenos y, por tanto, son insensibles a la presencia de testosterona. Así pues, esos ratones siguen la ruta de desarrollo por defecto que resulta en el fenotipo femenino.





(b)

Figura 23-11. Ratón transgénico que demuestra que *Sry* es el responsable del síndrome de reversión del sexo. (a) La amplificación del DNA genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) muestra que el ratón 33.13 carece de un marcador del cromosoma Y (*Zfy-1*) pero contiene el transgén *Sry*. M = marcadores de tamaño. (b) Los genitales externos del ratón transgénico XX con reversión del sexo 33.13 es indistinguible de la de un hermano normal XY (33.17), lo cual demuestra que el gen *Sry* es suficiente para causar el fenotipo de reversión sexual. (De P. Koopman, J. Gibbay, N. Vivian, P. Goodfellow, y R. Lovell-Badge, «Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for *Sry*», *Nature* 351, 1991, 117.)

COROLARIO

En mamíferos, un gen del cromosoma Y cifra un factor de transcripción que hace que las gónadas se conviertan en testículos. Estos actúan como un órgano director que, mediante la liberación de testosterona, dirige el desarrollo fenotípico masculino de todo el organismo.

Decisiones de destino binarias: Línea germinal o soma

En el desarrollo animal, la decisión más temprana es la de separar la línea germinal del soma. Una vez que ocurre, la separación es irreversible. Las células germinales no contribuyen a la formación de estructuras somáticas. Por su parte, las células somáticas no pueden formar gametos, de manera que nunca aportan material genético a la siguiente generación. Esta separación temprana implica que las modificaciones genéticas o reguladoras de las células somáticas, que se producen a lo largo del desarrollo, no tienen consecuencia alguna sobre la formación de gametos.

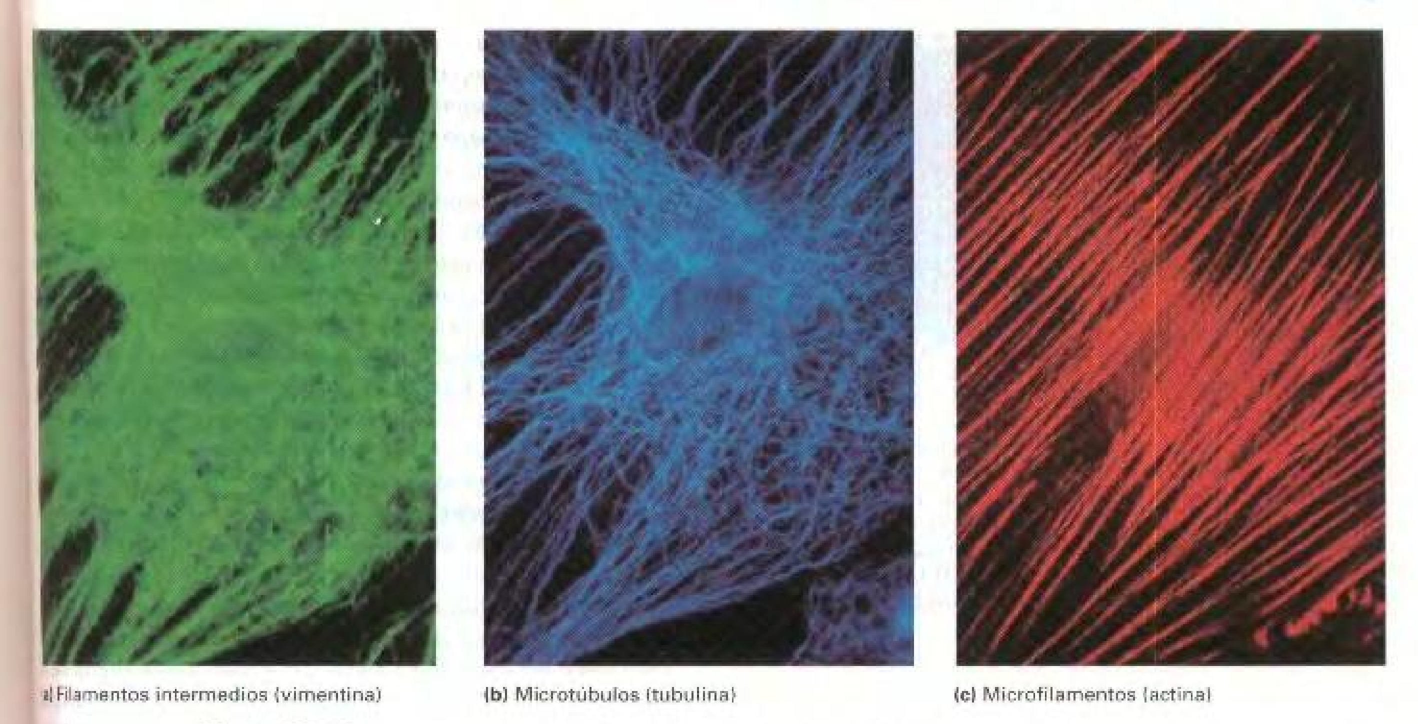


Figura 23-12. Distintos sistemas del citoesqueleto dentro de la misma célula. Se muestra la distribución de (a) la vimentina, proteína de los filamentos intermedios, (b) la proteína tubulina de los microtúbulos, y (c) la proteína actina de los microfilamentos. (Por cortesía de V. Small. Reproducción de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 Scientific American Books.)

Para decidir entre línea germinal o soma, el embrión aprovechará su maquinaria generadora de asimetrías —el **citoesqueleto**, el entramado que sostiene a la célula y le da forma— para localizar un determinante de línea germinal en un subgrupo de células embrionarias tempranas. Antes de enfrentarnos directamente a la cuestión de cómo se decide entre línea germinal o soma, debemos hacer algunas consideraciones sobre la naturaleza del citoesqueleto y de las asimetrías celulares.

El citoesqueleto de la célula

El citoesqueleto consta de varias redes de elementos filamentosos muy estructurados que recorren el interior de cada célula: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos (Fig. 23-12). Cada uno de ellos posee su propia organización estructural y está formado por unos conjuntos específicos de subunidades proteicas y por proteínas que promueven su formación o su desensamblaje. Además, cada tipo de elemento filamentoso participa en la formación de redes de mayor nivel de complejidad, gracias a diferentes tipos de proteínas que entrelazan de forma reversible unos elementos individuales con otros.

Varias de las funciones del citoesqueleto son importantes para explicar la formación de patrones: el control de la localización del plano de división mitótica de la célula, el control de la forma celular, y el transporte dirigido de moléculas y orgánulos dentro de la célula. Todas estas funciones dependen de la naturaleza polar de los elementos del citoesqueleto. La contribución a la formación de patrones de los microfilamentos y los microtúbulos —polímeros de subunidades de actina y tubulina, respectivamente— están mejor documentadas, de manera que nos centraremos en estas dos clases de elementos del citoesqueleto.

La asimetría intrínseca de los filamentos del citoesqueleto

La polaridad de los microfilamentos y los microtúbulos es crucial para la función que desempeñan como «autopistas» intrace-

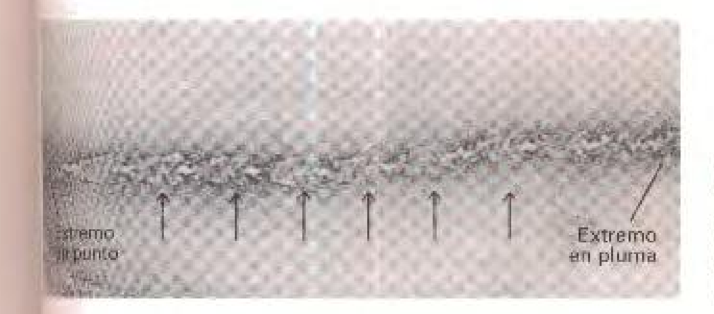


Figura 23-13. Polaridad de las subunidades en un microfilamento de actina. Los microfilamentos de actina normalmente no presentan este aspecto, pero aquí se han recubierto con una proteína que se une de modo que revela la polaridad del mismo. (Cortesía de R. Craig. Reproducido de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.I. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell. *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995, Scientific American Books.)

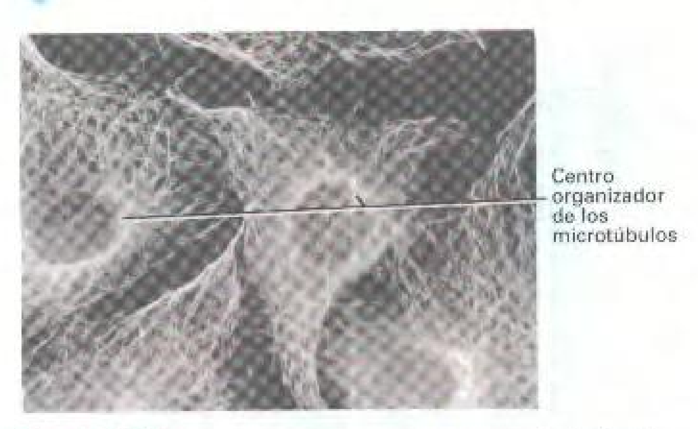
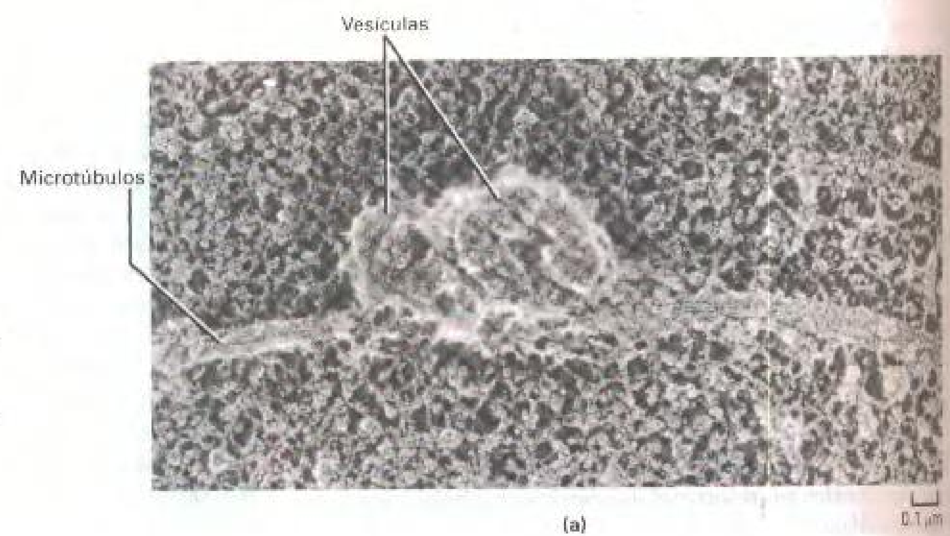
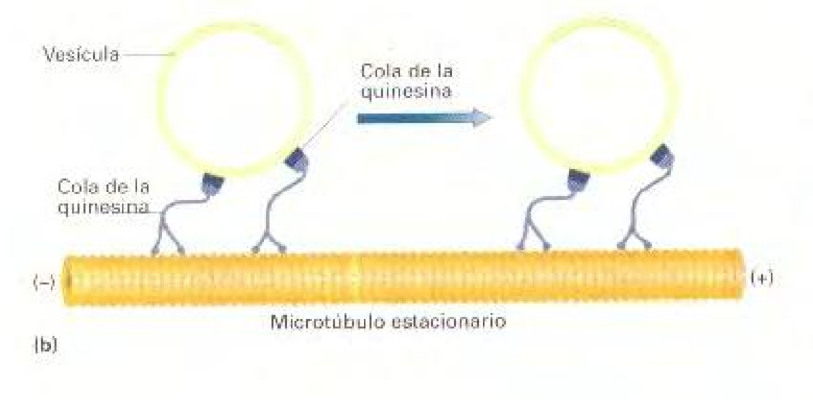


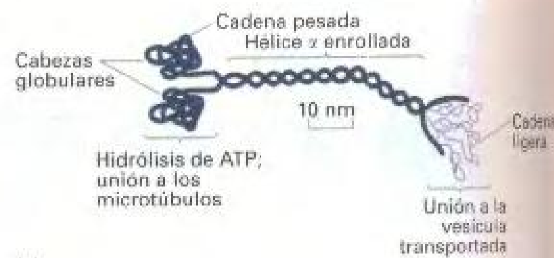
Figura 23-14. Micrografía de fluorescencia que muestra la distribución de la actina en un fibroblasto animal durante la interfase. Puede observarse cómo los microtúbulos se extienden radialmente desde el centro organizador de microtúbulos. Los extremos negativos (menos) de los microtúbulos quedan en el centro, mientras que los positivos (más) están en la periferia de la célula. (Cortesía de M. Osborn. Reproducido de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsadaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995, Scientific American Books.)

lulares. La capacidad de otras moléculas para moverse arriba y abajo por estas autopistas es la base de todas sus funciones celulares. Los microfilamentos y los microtúbulos son polímeros lineales polares —algo conceptualmente análogo a la polaridad 5′-3′ de las cadenas de DNA o RNA, aunque sus naturalezas moleculares sean tan diferentes (Fig. 23-13). Además, la polaridad de los elementos del citoesqueleto también se organiza dentro de la célula. Veamos, por ejemplo, los microtúbulos. Todos los extremos «–» (menos) de los microtúbulos se encuentran cerca del centro de la célula en la mayoría de los tipos celulares (Fig. 23-14). Esta posición se denomina **centro organizador de microtúbulos** (**MTOC,** del inglés *MicroTubule Organizing Center*). Los extremos «+» (más) de los microtúbulos se localizan en la periferia de la célula. Del mismo modo que los automóviles queman gasolina para obtener la energía que transforman en movimiento, unas proteínas «motoras» especiales hidrolizan ATP para obtener energía que será utilizada para impulsar el movimiento a lo largo del microtúbulo. Por ejemplo, una proteína llamada quinesina es capaz de moverse en dirección menos-más por el microtúbulo, transportando «cargamentos», como por ejemplo vesículas, del centro a la periferia de la célula (Figs. 23-15*a* y *b*). El «motor» —la parte de la quinesina que interacciona directamente con el filamento— se encuentra en la cabeza globular de la proteína (Fig. 23-15*c*). La cola de la

Figura 23-15. Movimiento de las vesículas a lo largo de los microtúbulos. (a) Micrografía electrónica de barrido de dos pequeñas vesículas adheridas a un microtúbulo. (b) Esquema del mecanismo propuesto por el que la quinesina une por su cola cargamentos celulares como las vesículas para transportarlos a lo largo del microtúbulo en dirección – a +, utilizando el dominio motor de su cabeza. (c) Esquema de la proteína quinesina que muestra las funciones asociadas a cada parte de la molécula. (Panel a tomado de B. J. Schnapp *et al.*, *Cell* 40, 1985, 455; cortesía de B. J. Schnapp, R. D. Valle, M. P. Sheetz, y T. S. Reese. Todos los paneles: Reproducidos de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995, Scientific American Books).







quinesina parece ser la parte a la que se une el cargamento, que puede ser una molécula individual, un orgánulo o cualquier otra partícula subcelular que deba ser transportada de una parte de la célula a otra. (Existen transportadores semejantes para los filamentos de actina).

¿Qué beneficio representa tener múltiples sistemas de citoesqueleto independientes? Probablemente, parte de la respuesta es la división del trabajo. Del mismo modo que las ciudades tienen redes complejas de calles que se cruzan entre sí para permitir viajar desde un punto de partida a cualquier otro destino, las células utilizan múltiples sistemas del citoesqueleto para transportar cargamentos de una parte a otra de la célula.

COROLARIO

El citoesqueleto actúa como un importante sistema en el movimiento dirigido de partículas subcelulares y orgánulos.

Localización de determinantes mediante asimetrías del citoesqueleto: la línea germinal

En muchos organismos, unas partículas visibles se distribuyen asimétricamente a las células que formarán la línea germinal. Se cree que estas partículas —llamadas gránulos P en *Caenorhabditis elegans*, gránulos polares en *Drosophila* y «nubes» en ranas— son vehículos transportadores que viajan por vías citoesqueléticas específicas para transferir los determinantes de células germinales que llevan consigo (moléculas reguladoras) a la célula apropiada. En *C. elegans* y *Drosophila*, las pruebas que relacionan la determinación de la línea germinal con el citoesqueleto son particularmente convincentes. Trataremos ambos casos.

Las primeras divisiones celulares del cigoto de *C. elegans* ofrecen un ejemplo de cómo las asimetrías del citoesqueleto ayudan a formar la línea germinal. Una de las ventajas de *C. elegans* como sistema experimental es que en todos los individuos siempre se produce el mismo patrón de divisiones celulares, un patrón que puede seguirse con facilidad al microscopio. En consecuencia, puede trazarse un árbol de linajes celulares que siga la ascendencia de cada una de las aproximadamente mil células somáticas del individuo adulto (véase el Cap. 22).

El cigoto unicelular de *C. elegans* que se produce tras la fecundación se denomina célula P_0. Ésta es una célula elipsoidal, que se divide asimétricamente a lo largo del eje mayor para producir una célula anterior AB más grande y otra posterior P_1 más pequeña (Fig. 23-16). Ésta es una división importante, puesto que establece papeles especializados para los descendientes de esas dos primeras células. Los descendientes de la célula AB generarán la mayoría de las células de la piel del gusano (el hipodermo) y la mayor parte de las neuronas del sistema nervioso, mientras que la célula P_1 dará lugar a la mayoría de las células musculares, todas las del sistema digestivo y las células germinales.

El destino hacia la línea germinal en las primeras divisiones de la célula P_0 y sus sucesivos descendientes (P_1, P_2, etc.) está relacionado con la distribución de ciertas partículas citoplásmicas llamadas gránulos P. Estos gránulos se incorporan exclusivamente a la célula P_1 en la primera división. Cuando ésta se divide, también asimétricamente, los gránulos P se incorporan a la

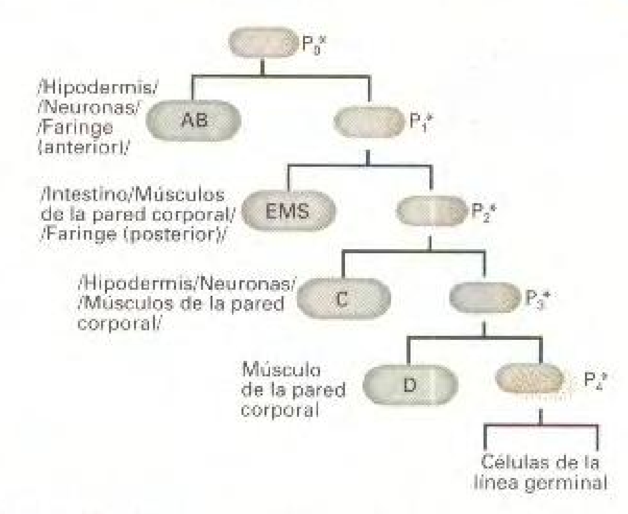


Figura 23-16. Desarrollo temprano de *C. elegans*. Se muestran la separación temprana de los linajes a partir del cigoto, indicándose los tipos celulares maduros que derivan de las diferentes células hijas procedentes de las primeras divisiones. Puede verse cómo la totalidad de la línea germinal procede de la célula P_4. Cada una de las divisiones celulares P marcadas con un asterisco es asimétrica, de modo que la célula posterior hereda todos los gránulos P, que se cree que son los determinantes de la línea germinal en el gusano. Las letras (p. ej., AB o EMS) simbolizan las distintas células hijas.

célula descendiente P_2 y, de igual modo, en la siguiente división, a la célula P_3, y así sucesivamente. Sólo la célula P_x que contiene esos gránulos P se convertirá en la línea germinal del gusano; el resto de las células serán somáticas. La distribución asimétrica de los gránulos P depende de los microfilamentos. Si, en el momento adecuado, se aplican a la célula P_0 ciertos compuestos como la citocalasina, se bloquea la polimerización de las subunidades de actina en los microfilamentos. Si se impide la polimerización de los microfilamentos, los gránulos P aparecen distribuidos simétricamente entre las dos células descendientes. (Debido, probablemente a que otros determinantes de destino también se distribuyen anormalmente por efecto del bloqueo de la polimerización de la actina, los embriones resultantes son bastante «confusos» y mueren como masas celulares que se parecen a cualquier cosa menos a un gusano normal).

En el desarrollo temprano de *Drosophila*, el citoesqueleto también se utiliza para localizar la estructura que contiene los determinantes de la línea germinal: los gránulos polares. Estos gránulos se forman durante la oogénesis, en el ovario de la madre, y terminan asociados al polo posterior del oocito gracias a su unión a uno de los extremos de los microtúbulos. Ahí permanecen durante toda la embriogénesis temprana, hasta la novena división nuclear, cuando unos cuantos núcleos emigran al polo posterior. (Debemos observar que un aspecto inusual del desarrollo temprano de *Drosophila* es que las primeras 13 mitosis son divisiones nucleares sin las divisiones celulares correspondientes, lo cual convierte al embrión temprano en un sincitio: una célula multinucleada). Tras la novena división nuclear, la membrana plasmática del embrión se invagina en su polo posterior para rodear a cada núcleo, englobando parte de la masa citoplásmica que incluye los gránulos polares. Así se generan las células polares, las primeras células mononucleadas del embrión

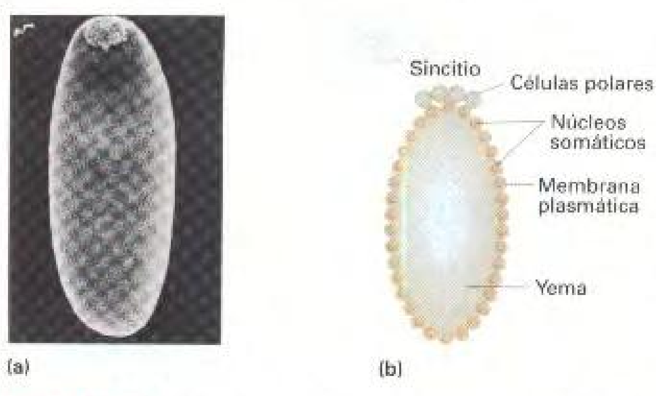


Figura 23-17. Formación de las células polares durante la fase sincitial del desarrollo temprano del embrión de *Drosophila*. (a) Microfotografía electrónica de barrido de un embrión de *Drosophila* desprovisto de su cubierta. Puede verse que las células polares (la caperuza de células en la parte superior del embrión) se sitúan fuera del sincitio somático. (b) Esquema de una sección longitudinal del embrión representado en el panel a, en el que se muestra cómo las células de la línea germinal —las células polares— ya se han formado, mientras que el soma todavía está compuesto por un sincitio de núcleos. (Adaptado de F. R. Turner y A. P. Mahowald, *Developmental Biology* 50, 1976, 95.)

y las que darán lugar de forma exclusiva a la línea germinal de la mosca (Fig. 23-17)

¿Cómo llegan a asociarse los gránulos polares al polo posterior del oocito? De nuevo, la localización subcelular se consigue gracias a una de las redes del citoesqueleto. A diferencia de *C. elegans*, en el que parecen ser los microfilamentos de actina los que forman la estructura polarizada a la que se unen los gránulos P, aquí son los microtúbulos de tubulina los que aportan la asimetría esencial. Se trata, probablemente, de un simple accidente de la historia evolutiva de estos organismos. En cada uno de los casos, los determinantes de la línea germinal evolucionaron para aprovechar cualquier sistema citoesquelético que ofreciera una asimetría orientada adecuadamente.

Formación de patrones complejos: establecimiento de la información posicional

En esta sección y las que siguen sobre el desarrollo temprano de *Drosophila*, se resumen los resultados de un gran número de análisis mutacionales. La lógica que sigue este tipo de análisis es que, observando las perturbaciones en el desarrollo de individuos mutantes en un gen concreto, podemos comprender cómo la proteína que ese gen cifra contribuye al desarrollo normal. Para ello, es especialmente eficaz la combinación de estos análisis genéticos con la clonación y el análisis molecular de los productos proteicos de estos genes. A partir de estos análisis combinados, hemos podido comprender algunos mecanismos importantes que participan en los procesos globales del desarrollo.

Análisis mutacional del desarrollo temprano de *Drosophila*

Las primeras ideas sobre el control genético de la formación de patrones surgieron de estudios realizados con la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*. La razón de que *Drosophila* haya resultado ser una mina de oro para los investigadores es que permite abordar los problemas del desarrollo tanto con técnicas genéticas como moleculares. Veamos las técnicas básicas de ambos tipos que se emplean.

El embrión de *Drosophila* ha sido especialmente importante para comprender la generación del plan corporal básico de los animales. Una razón importante es que la formación del exoesqueleto larvario durante la embriogénesis, permite en sí mismo la fácil identificación de fenotipos mutantes del plan general del organismo. El exoesqueleto de la larva de *Drosophila* se deposita en el embrión como un mosaico. Cada estructura del exoesqueleto es generada por las células epidérmicas situadas debajo. Con su intrincado patrón de pelos, muescas y otras estructuras, el exoesqueleto ofrece muchos rasgos que sirven como marcadores de los destinos asumidos por las numerosas células epidérmicas. En particular, hay muchos elementos anatómicos distintos a lo largo de los ejes anteroposterior (A-P) y dorsoventral (D-V). Además, como todos los nutrientes necesarios para el desarrollo hasta el estado de larva están ya acumulados en el cigoto, los embriones mutantes con graves alteraciones en los destinos celulares A-P o D-V, se desarrollan, así y todo, hasta el final de la embriogénesis y generan una larva mutante. El exoesqueleto de estas larvas refleja los destinos mutantes asignados a los grupos de células epidérmicas, permitiendo identificar de esta forma genes que merecen un análisis más detallado.

Distintos investigadores, principalmente Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Wieschaus y sus colaboradores, han llevado a cabo búsquedas exhaustivas de mutantes, saturando prácticamente el genoma en cuanto a mutaciones que alteran los patrones A-P o D-V del exoesqueleto larvario. Estas búsquedas permitieron identificar dos clases generales de genes que afectan al plan básico del organismo: genes que actúan cigóticamente y genes de efecto materno (Fig. 23-18). Los primeros son aquellos cuyos productos

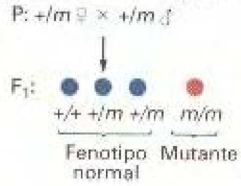




Figura 23-18. Experimentos genéticos para distinguir entre mutaciones recesivas cigóticas y de efecto materno. Se muestran las diferencias genéticas entre mutaciones recesivas (a) de acción cigótica y (b) de efecto materno. (a) Los fenotipos de la descendencia reflejan simplemente su propio genotipo (es decir, el del cigoto). (b) Los fenotipos de la descendencia reflejan el genotipo de la madre. De ahí que estas mutaciones se conozcan como de efecto o acción materna.

génicos contribuyen al desarrollo temprano y se expresan exclusivamente a partir de la formación del cigoto. Forman parte del propio DNA del cigoto y son el tipo «normal» de genes a los que estamos acostumbrados. Las mutaciones recesivas en estos genes provocan fenotipos mutantes sólo en los individuos homocigóticos para tales mutaciones. Los genes de la segunda clase, los de efecto materno, afectan al desarrollo temprano aportando productos génicos del ovario de la madre al oocito en desarrollo. En el caso de mutaciones de efecto materno, el fenotipo de la descendencia no depende de su propio genotipo, sino del genotipo de la madre. Una mutación recesiva de efecto materno producirá animales mutantes sólo si la madre es homocigótica para la mutación.

De igual importancia para la identificación mutacional de genes que afectan al plan básico del organismo es la facilidad con la que pueden clonarse y caracterizarse molecularmente. Cualquier gen de *Drosophila* puede clonarse si se conoce bien su posición en el mapa cromosómico, mediante técnicas de DNA recombinante como las descritas en los Capítulos 12 y 13. El análisis de los genes clonados ofrece a menudo información valiosa sobre la función de sus productos proteicos, normalmente identificando otras proteínas relacionadas de secuencia similar, mediante la comparación con todas las secuencias de proteínas depositadas en las bases de datos públicas. Además, puede analizarse el patrón de expresión espacial y temporal de (1) un mRNA, utilizando secuencias marcadas de DNA de cadena sencilla complementarias al mRNA, para detectarlo mediante hibridación *in situ*, o (2) una proteína, empleando anticuerpos marcados histoquímicamente que se unen a esa proteína de forma específica.

También se hace un uso extenso de las técnicas de mutagénesis *in vitro*, utilizando elementos *P* para transformar la línea germinal de *Drosophila* (Cap. 13). Un gen clonado implicado en la formación de patrones se muta en el tubo de ensayo y se devuelve a la mosca, en la que puede estudiarse ahora qué efecto ha tenido la mutación sobre la función del gen.

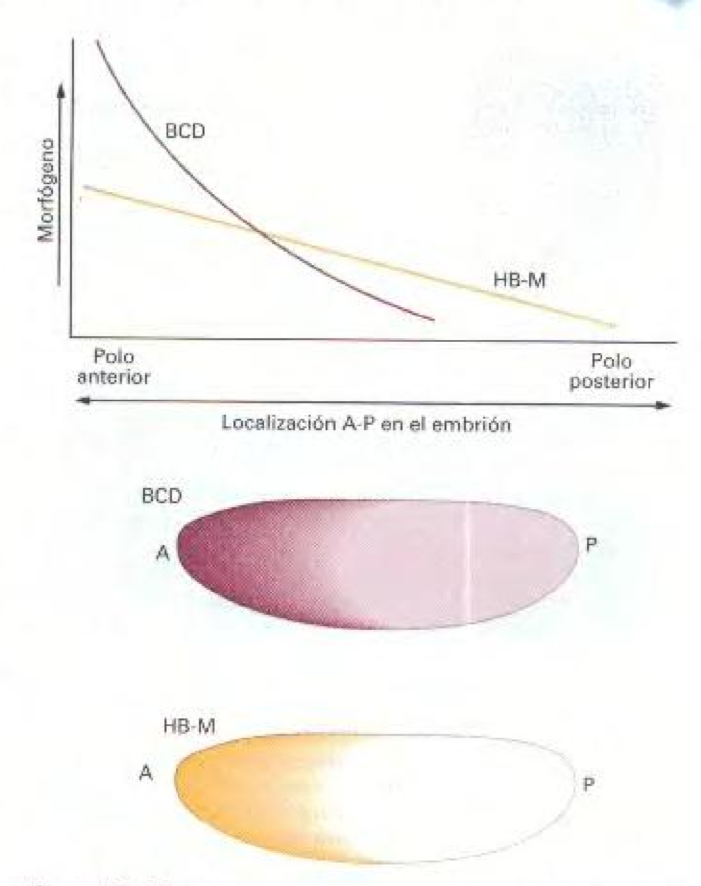


Figura 23-19. Gradientes de las proteínas BCD y HB-M. El gradiente de BCD es más pronunciado, de modo que la proteína BCD no se detecta en la mitad posterior del embrión temprano de *Drosophila*. El gradiente de HB-M es más suave y la proteína HB-M puede detectarse a niveles significativos en la mitad posterior del embrión.

Las asimetrías del citoesqueleto y el eje anteroposterior de *Drosophila*

Como veremos, la línea germinal no es lo único que se establece mediante un determinante anclado a los microtúbulos, sino que este mecanismo también se emplea para la formación del eje anteroposterior (A-P) del cuerpo. La información posicional a lo largo del eje A-P del embrión sincitial de *Drosophia* se establece inicialmente mediante la creación de gradientes de concentración de dos factores de transcripción: las proteínas BCD y HB-M. La proteína BCD, cifrada en el gen *bicoid* (*bcd*), se distribuye en el embrión temprano de acuerdo con un gradiente pronunciado, mientras que la proteína HB-M, cifrada en el gen *hunchback* (*hb*) se distribuye en un gradiente más suave y extendido (Fig. 23-19). Ambos gradientes tienen su punto más alto en el polo anterior. Aunque de maneras algo distintas, estos gradientes dependen de la difusión de proteínas desde una fuente localizada: la traducción localizada de dos especies de mRNA, una de ellas asociada a los microtúbulos en el polo anterior y la otra en el polo posterior del embrión sincitial.

El origen del gradiente de BCD es bastante simple. El mRNA de *bcd*, transferido durante la oogénesis al oocito en desarrollo, se asocia a los extremos «–» (menos) de los microtúbulos localizados en el polo anterior (Fig. 23-20*a*). La traducción de la proteína BCD comienza hacia la mitad de las divisiones nucleares tempranas del embrión sincitial. La proteína difunde por el citoplasma común del sincitio. Como se trata de un factor de transcripción, contiene señales para dirigirse a los núcleos. Por mera difusión, aquellos núcleos más cercanos a la fuente de traducción (el polo anterior) incorporan una mayor cantidad de la proteína BCD que los más alejados; esta incorporación diferencial se traduce en el pronunciado gradiente de la proteína BCD (Fig. 23-20*b*).

El origen del gradiente de la proteína HB-M es más complejo. Se produce mediante un mecanismo de regulación postranscripcional. El mRNA de *hb-m* es de origen materno, siendo transportado durante la oogénesis al oocito en desarrollo, y distribuyéndose de modo uniforme por todo el oocito y el embrión sincitial. Sin embargo, la lectura del mRNA de *hb-m* es bloqueada por una proteína represora de la traducción: la proteína NOS, cifrada en el gen *nanos* (*nos*). Como el mRNA de *bcd*, el mRNA de *nos* es de origen materno. Sin embargo, a diferencia del mRNA de *bcd*, el mRNA de *nos* se localiza en el polo posterior mediante su asociación a los extremos «+» (más) de los microtúbulos (Fig. 23-20*c*). Cuando comienza la traducción del mRNA de *nos*, hacia la mitad de la fase sincitial de la embriogénesis tem-

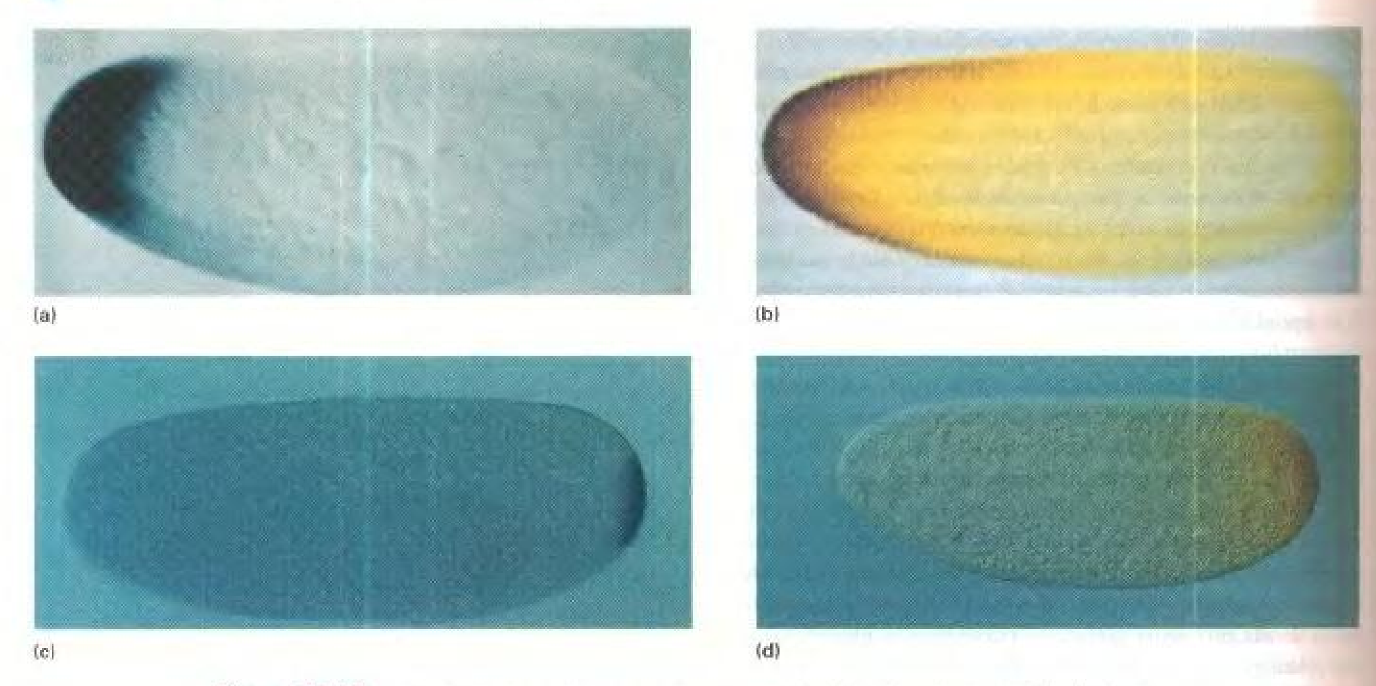


Figura 23-20. Microfotografías en las que se muestra la expresión de los determinantes A–P localizados en el embrión. (a) Mediante hibridación *in situ* de RNA, puede verse la expresión localizada del mRNA *bcd* en el extremo anterior (izquierda) del embrión. (b) Mediante tinción con anticuerpos, puede verse el gradiente de la proteína BCD (en color marrón), de concentración máxima en el extremo anterior. (c) De modo similar, el mRNA *nos* se localiza en el extremo posterior (derecha) del embrión, y (d) la proteína NOS se distribuye en un gradiente cuya concentración máxima está en el extremo posterior. (Partes a y b tomadas de Christiane Nüsslein-Volhard. «Determination of the Embryonic Axes of *Drosophila*» *Development*, Supl. 1, 1991, 1. Partes c y d cedidas por E. R. Gavis, L. K. Dickinson y R. Lehman, Massachusetts Institute of Technology.)

prana, la proteína NOS se distribuye por difusión en un gradiente opuesto al de BCD. El gradiente de NOS tiene su punto más alto en el polo posterior y desciende a niveles basales hacia la mitad del eje A-P (Fig. 23-20*d*). La proteína NOS es capaz de bloquear de forma específica la traducción del mRNA de *hb-m*. Así, el gradiente posteroanterior de represión de la traducción debido a NOS genera el gradiente suave anteroposterior de la proteína HB-M.

COROLARIO

La localización de mRNA dentro de la célula se produce mediante el anclaje de los mRNA a uno de los extremos de las fibras polarizadas del citoesqueleto.

¿Cómo quedan atrapados los mRNA de *bcd* y *nos* en extremos opuestos de los microtúbulos polarizados del oocito y del embrión sincitial temprano? Ambos contienen secuencias específicas de unión a microtúbulos en sus UTR (regiones no traducidas, del inglés *UnTranslated Regions*) situadas en posición 3′ del codón de parada de la traducción. (Los mRNA eucarióticos siempre contienen una secuencia situada en posición 5′ del inicio de la traducción, la 5′ UTR, y otra situada en 3′ del codón de parada, la 3′ UTR. En algunos mRNA, estas regiones son muy cortas; pero, en otros, pueden tener un tamaño de varias kilobases. Estamos descubriendo que, en muchos casos, como ocurre aquí, hay secuencias dentro de las 3′ UTR que ejercen funciones reguladoras específicas).

Las secuencias de localización de la 3′ UTR del mRNA de *bcd* unen una proteína que también se asocia a los extremos «–» de los microtúbulos. Por el contrario, la 3′ UTR del mRNA de *nos* contiene secuencias de localización que se unen a otras proteínas, que su vez se asocian a los extremos «+» de los microtúbulos. (En realidad, la localización del mRNA de *nos* en el polo posterior incluye otros pasos intermedios: primero, las secuencias de localización de las 3′ UTR se anclan a moléculas de los gránulos polares, las cuales, a su vez, se unen a los extremos «+» de los microtúbulos).

¿Cómo podemos demostrar que las secuencias de localización residen en las 3′ UTR de los mRNA? En parte, se ha demostrado mediante experimentos de intercambio de secuencias. Por ejemplo, si se genera un gen sintético que produce un mRNA con la 5′ UTR y la región traducible del mRNA normal de *nos* unida a la 3′ UTR del mRNA normal de *bcd*, y se inserta en el genoma de la mosca, este mRNA mixto *nos-bcd* se localizará en el polo anterior del oocito. Esto genera un gradiente doble de NOS: uno que va desde el polo anterior al posterior (debido al mRNA transgénico) y otro que va desde el polo posterior al anterior (debido al mRNA normal del gen *nos* endógeno). Esta manipulación produce un embrión muy extraño constituido por dos imágenes especulares de la mitad posterior de un embrión normal y carente de la mitad anterior (Fig. 23-21). Este embrión de doble abdomen surge porque la proteína NOS está ahora presente a lo largo de todo el embrión y reprime la traducción del mRNA de *hb-m* (también reprime al mRNA de *bcd*, aunque no

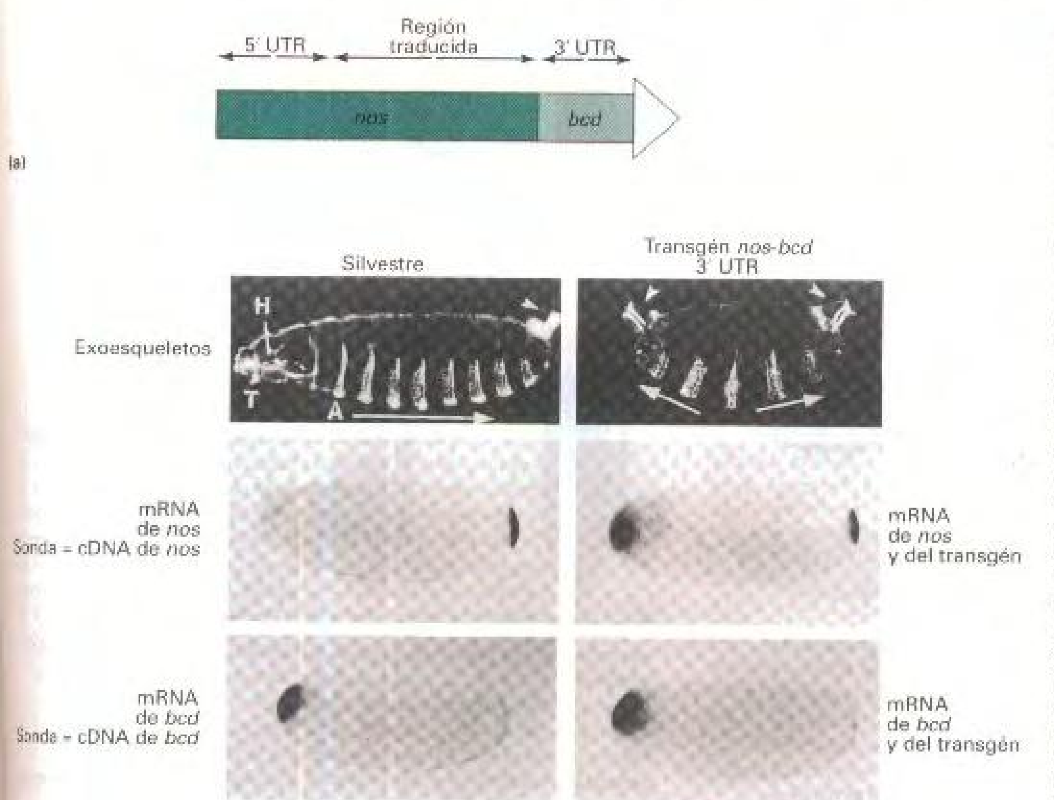


Figura 23-21. Efecto de la sustitución de la 3' UTR del mRNA de *nanos* por la 3' UTR del mRNA de *bicoid* sobre la localización del mRNA y el fenotipo del embrión. (a) Estructura del transgén *nos-bcd* 3' UTR. (b) Efecto del transgén en el desarrollo embrionario. Los embriones y la larva de la izquierda proceden de madres silvestres. Los de la derecha derivan de madres transgénicas. Todos los embriones se muestran orientados de modo que el extremo anterior aparece a la izquierda y el posterior a la derecha. Se muestran los exoesqueletos de las larvas para su comparación. El transgén provoca la formación de dos abdómenes dispuestos como imágenes especulares perfectas. En el embrión de una madre transgénica, el mRNA que cifra la proteína NOS está presente en ambos polos. La proteína NOS inhibe la traducción del mRNA *hb-m* (y también la del mRNA *bcd*). (De E. R. Gavis y R. Lehmann, «Localization of *nanos* RNA Controls Embryonic Polarity», *Cell* 71, 1992, 303.)

stá claro que ésta sea una función normal en los animales silvestres). Veremos con más detalle cómo se genera la información posicional A-P en la sección siguiente.

COROLARIO

La información posicional del eje A-P de *Drosophila* se genera mediante gradientes de proteínas. Los gradientes dependen en última instancia de la difusión de las proteínas recién traducidas a partir de fuentes localizadas de mRNA específicos anclados por sus 3' UTR a los extremos de los filamentos del citoesqueleto.

Estudio del gradiente BCD

¿Cómo sabemos que moléculas como BCD y HB-M contribuyen a la informacion posicional anteroposterior? Veamos en detalle el caso de BCD. En primer lugar, las mutaciones en el gen *bcd* alteran los destinos «anteriores». Los embriones derivados de madres homocigóticas para mutaciones nulas en el gen *bcd* carecen de los segmentos anteriores (Fig. 23-22). Si, por otro lado, sobreexpresamos el gen *bcd* en la madre, incrementando el número de copias del alelo bcd^{+} hasta tres, cuatro o más, «desplazamos» los destinos que aparecen normalmente en posiciones anteriores hacia posiciones cada vez más posteriores del embrión (Fig. 23-23). Estas observaciones sugieren que la proteína BCD ejerce un control general sobre la información posicional anterior.

En segundo lugar, el mRNA de *bcd* puede sustituir perfectamente la actividad determinante anterior presente en el citoplasma de la región anterior (Fig. 23-24). Si se elimina mediante ción el citoplasma del extremo anterior de un embrión sincitial, no se desarrollan los segmentos anteriores (cabeza y tórax). Si al embrión tratado de esa forma se le vuelve a inyectar citoplasma de la región anterior de otro embrión, se restablece la formación de los segmentos anteriores y se desarrolla una larva normal. De modo similar, se puede sintetizar un mRNA *bcd in*

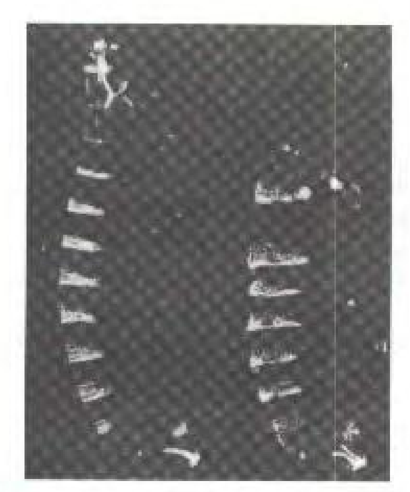


Figura 23-22. Microfotografías de los exoesqueletos de larvas derivadas de madres silvestres y *bcd*, una mutación letal de efecto materno. Estas microfotografías están tomadas en campo oscuro, de modo que las estructuras densas aparecen blancas, como si se tratara de un negativo fotográfico. Se aprecian las bandas brillantes de dentículos, repetidas de forma segmental, presentes en la cara ventral del embrión. Los genotipos maternos y los fenotipos de las larvas, así como los tipos de mutación, son los siguientes: (izquierda) fenotipo silvestre, normal; (derecha) *bcd* (*bicoid*), faltan la cabeza y las estructuras torácicas (elementos anteriores).

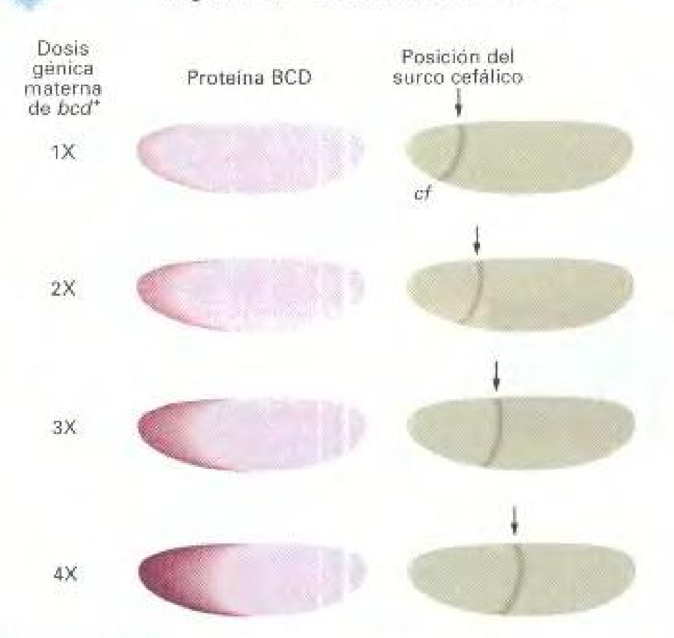


Figura 23-23. La concentración de la proteína BCD determina los destinos celulares A-P. Puede alterarse la cantidad de proteína BCD variando el número de copias del alelo bcd^+ en la madre. Así, madres portadoras de una a cuatro copias del alelo bcd^+ dan lugar a embriones con cantidades crecientes de proteína BCD. (Dos copias constituyen la dosis génica normal diploide). Las células que se invaginan para formar el surco cefálico (cf) están determinadas por una concentración específica de la proteína BCD. En la serie de una a cuatro copias maternas del alelo bcd^+, esta concentración específica se alcanza cada vez en posiciones más posteriores del embrión. Consecuentemente, la posición del surco cefálico (marcada dorsalmente con una flecha) se establece cada vez más hacia el extremo posterior. (Adaptado de W. Driever y C. Nüsslein-Volhard, «The Bicoid Protein Determines Position in the *Drosophila* Embryo in a Concentration-Dependent Manner», *Cell* 54, 1989, 100.)

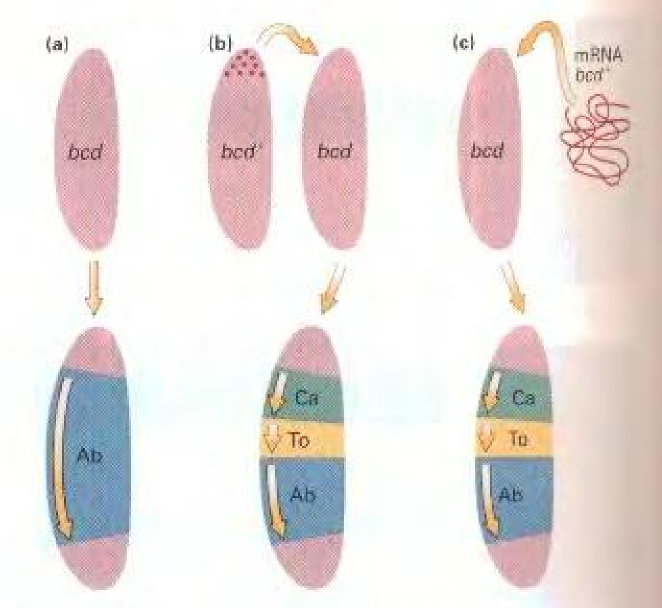


Figura 23-24. El fenotipo de «falta de la región anterior» producido por mutaciones en *bcd* puede revertirse con citoplasma silvestre o mRNA bcd^+ purificado. (a) Los embriones descendientes de madres mutantes *bcd* carecen de los segmentos anteriores (cabeza y tórax). (b) Si se inyecta citoplasma de la región anterior de un embrión silvestre temprano en la región anterior de un embrión de madre mutante *bcd*, se obtiene un embrión perfectamente normal y una larva completa. El citoplasma de cualquier otra región no es capaz de producir este rescate. (c) Si se inyecta mRNA bcd^+ en la región anterior de un embrión de madre mutante *bcd* también se observa el patrón de segmentación silvestre. (Ab, abdomen; Ca, cabeza; To, tórax.) (Adaptado de C. Nüsslein-Volhard, H. G. Frohnhöfer y R. Lehman, «Determination of Anteroposterior Polarity in *Drosophila*», *Science* 238, 1987, 1679.)

vitro e inyectarlo en la región anterior de un embrión al que se le había extraído el citoplasma anterior. De nuevo, se desarrolla una larva normal. Contrariamente a lo que ocurre con el citoplasma de la región anterior, si se inyecta citoplasma de la región media o posterior del embrión sincitial, no se restaura la formación de los segmentos anteriores. Así pues, el determinante anterior debe estar localizado *sólo* en el extremo anterior del embrión temprano. Como ya hemos dicho, ahí es donde se encuentra exactamente el mRNA de *bcd*.

En tercer lugar, como ya hemos dicho también, la proteína BCD muestra la distribución asimétrica y gradual predicha para cumplir su papel generador de información posicional.

Señalización de célula a célula y el eje dorsoventral de *Drosophila*

En los ejemplos que hemos considerado hasta ahora, los determinantes eran productos intracelulares: mRNA o complejos macromoleculares más grandes contenidos en el oocito. En otras muchas circunstancias, la información posicional depende de proteínas secretadas por un subgrupo localizado de células dentro de un campo de desarrollo. Estas proteínas secretadas difunden por el espacio extracelular, generando un gradiente de concentración de ligando. Éste activa entonces a las células diana mediante un receptor presente en estas células: es un sistema de transducción de señal dependiente de concentración.

Un ejemplo de este mecanismo de generar información posicional es el establecimiento del eje dorsoventral (D–V) en el embrión temprano de *Drosophila*. El efecto inmediato de la información posicional D–V será la creación de un gradiente de actividad de la proteína DL en las células dispuestas a lo largo del eje D–V. La proteína DL es un factor de transcripción cifrado en el gen *dorsal* (*dl*). Existe en dos formas: (1) factor de transcripción activo localizado en el núcleo, y (2) proteína inactiva localizada en el citoplasma, donde se encuentra secuestrada formando un complejo con la proteína CACT, cifrada en el gen *cactus* (*cact*). La concentración de proteína DL *activa* determinará el destino de la célula a lo largo del eje D–V. Tanto el mRNA de *dl* como la proteína DL se distribuyen uniformemente en el oocito y en el embrión temprano. Sin embargo, en la fase tardía de embrión sincitial, se forma un gradiente de proteína DL activa, cuyo punto más alto se sitúa en la línea media ventral del embrión (Fig. 23-25).

¿Cómo se genera el gradiente de proteína DL activa con la información posicional? Los hechos fundamentales tienen lugar durante la oogénesis, mediante la interacción entre el propio oocito y la capa de células somáticas que lo rodean, las células del folículo. Las células foliculares situadas en la parte ventral del oocito sintetizan y secretan algunas proteínas que generan un gradiente de activación de un precursor secretado del ligando SPZ, cifrado en el gen *spaetzle* (*spz*). Las células folicula-

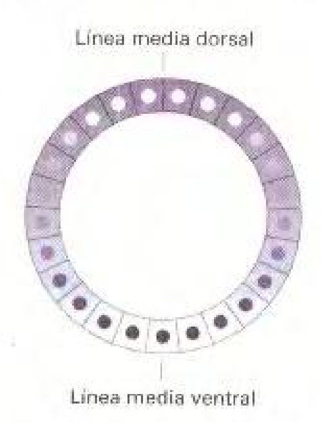


Figura 23-25. Distribución de DL en respuesta a la señal SPZ, cifrada en el gen *spaetzle* (*spz*). Se representa una sección transversal de un embrión de *Drosophila* en el estadio de blastodermo celular, donde la línea media dorsal queda en la parte superior y la ventral abajo. Puede verse cómo la proteína DL está en el núcleo de las células ventrales, distribuida uniformemente en las células laterales y en el citoplasma de las dorsales. (Adaptado de S. Roth, D. Stein y C. Nüsslein-Volhard, «A Gradient of Nuclear Localization of the Dorsal Protein Determines Dorsoventral Pattern in the *Drosophila* embryo», *Cell* 59, 1989, 1196.)

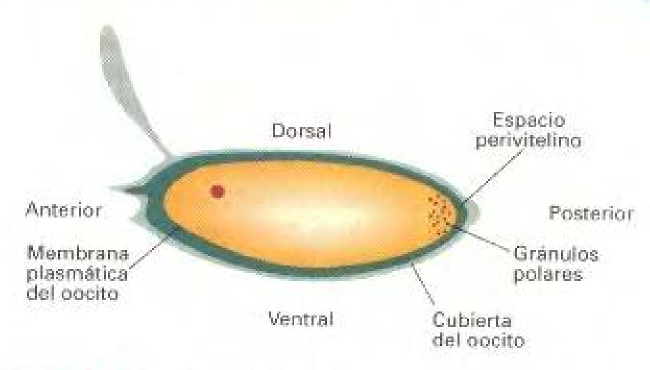


Figura 23-26. Oocito maduro. Las células foliculares que generan y rodean la cubierta no se representan, y la membrana plasmática del oocito queda por debajo de la cubierta. Pueden verse los gránulos polares en el extremo posterior del oocito. (Adaptado de Christiane Nüsslein-Volhard, «Determination of the Embryonic Axes of *Drosophila*», *Development*, Supl. 1, 1991, 1.)

Figura 23-27. Ruta de señalización que dirige la formación del gradiente de localización nuclear frente a la localización citoplásmica de la proteína DL. (a) Sección transversal de un embrión de *Drosophila*. Se muestran las células del blastodermo, por dentro de la membrana plasmática, y el espacio perivitelino, entre la cara interior de la cubierta (membrana perivitelina) y la membrana plasmática, lugar donde se produce la síntesis del ligando SPZ en la región ventral del embrión. (b) El ligando SPZ se une al receptor TOLL, activando una cascada de transducción de señal mediada por dos proteínas, TUB y PLL, que finalmente conduce a la fosforilación de DL, que en consecuencia se desacopla de la proteína CACT. DL queda así libre para migrar al interior del núcleo, donde actúa como factor de transcripción regulando los genes cardinales D–V. (Adaptado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995, Scientific American Books.)

res también fabrican la cubierta del oocito (mostrada en la Fig. 23-26), cuya capa interior es la membrana vitelina (mostrada en la Fig. 23-27*a*). El ligando SPZ se une temporalmente a estructuras de la membrana vitelina, que lo secuestran hasta cerca del final de la fase sincitial de la embriogénesis temprana, cuando es liberado. El ligando SPZ activo (cuya mayor concentración se sitúa en la línea media ventral) se une entonces al receptor transmembrana TOLL, cifrado en el gen *toll*, que se encuentra distribuido uniformemente en la membrana plasmática del oocito (Fig. 23-27). De forma dependiente de concentración, el complejo SPZ-TOLL dispara una ruta de transducción de señal que termina en la fosforilación de las proteínas citoplasmáticas DL (inactiva) y CACT, que se encuentran formando el complejo DL-CACT (Fig. 23-27*b*). La fosforilación de DL y CACT provoca cambios conformacionales que disocian el complejo citoplásmico. La proteína DL fosforilada libre es capaz entonces de migrar al interior del núcleo, donde actúa como factor de transcripción activando los genes necesarios para el establecimiento de los destinos de desarrollo ventrales.

COROLARIO

Puede establecerse información posicional mediante la señalización célula-célula que implica un gradiente de concentración de una molécula secretada.

Las dos clases de información posicional

Como resumen de esta sección, la idea más importante es que los ejemplos específicos que hemos considerado de información posicional pertenecen a una de dos categorías (Fig. 23-28).

- *Localización de mRNA dentro de una célula.* Este tipo de información posicional puede utilizarse sólo en aquellos casos en los que el campo de desarrollo comienza como una única célula. Se emplea para generar gradientes de información posicional en casos inusuales, como la embriogénesis temprana de *Drosophila*, porque en ese momento, el embrión es un sincitio unicelular. De manera general, se emplea más como una forma de repartir asimétricamente determinantes locales entre células hijas.
- *Generación de un gradiente de concentración de una molécula difusible extracelular.* Este tipo de información posicional puede utilizarse en campos de desarrollo multicelulares, porque el gradiente es extracelular y, por tanto, no está acotado por los límites de las células individuales. De hecho, ahora sabemos de varios casos en los que los gradientes de concentración de ligandos proteicos secretados que activan receptores y sistemas de transducción de señales cumplen las propiedades esperadas de los clásicos **morfógenos** de desarrollo, literalmente, determinantes dependientes de concentración.

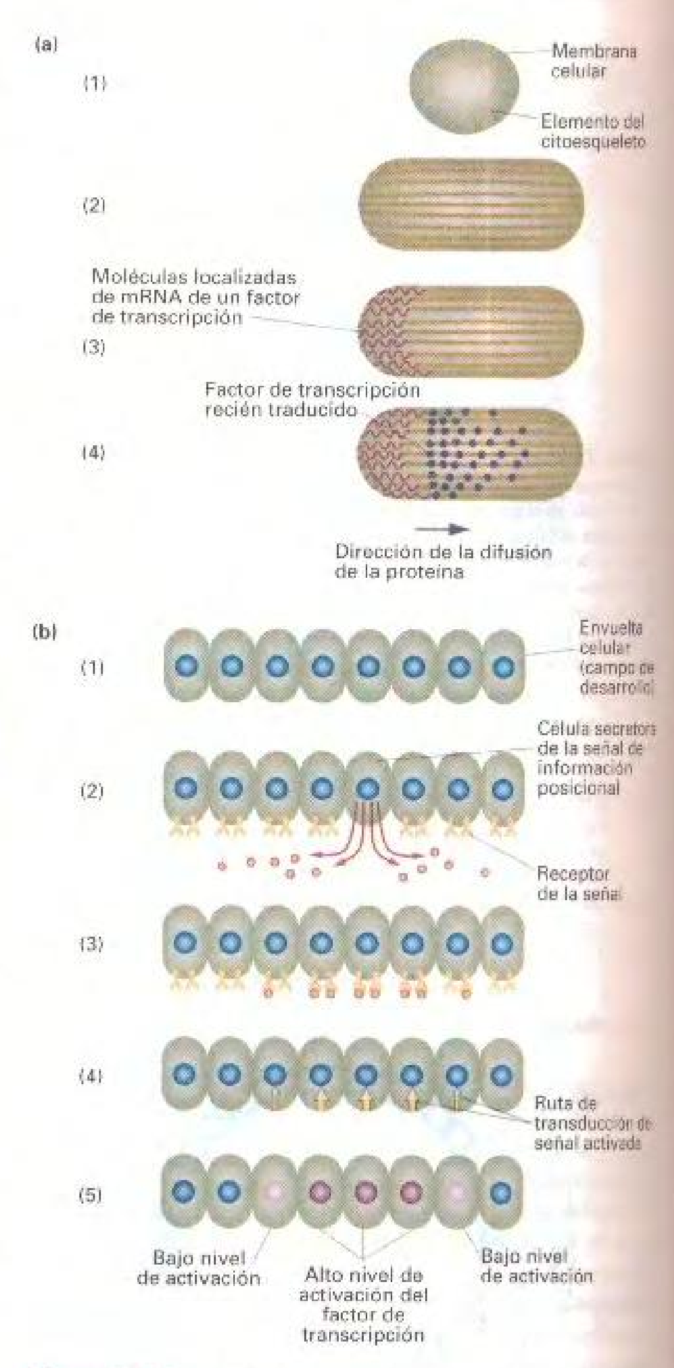


Figura 23-28. Los dos tipos generales de información posicional. (a) La organización asimétrica del citoesqueleto permite la localización de un mRNA que cifra un factor de transcripción, generando información posicional. La traducción del mRNA anclado dará lugar a la difusión del factor de transcripción que se está sintetizando y la formación de un gradiente de ese factor, con su máximo situado cerca del punto de anclaje del mRNA. (b) La secreción de una molécula señalizadora desde una fuente localizada proporciona información posicional al activar el aparato de transducción de señal y los factores de transcripción diana de acuerdo con la concentración de molécula señal unida a su receptor transmembrana.

Formación de patrones complejos: uso de la información posicional para establecer el destino de las células

Una vez generada la información posicional, es necesario disponer de un sistema que pueda interpretar los datos posicionales. Volvemos a utilizar la analogía geográfica: no es suficiente con disponer de un sistema de longitudes y latitudes; necesitamos un equipo que pueda recibir información sobre longitud y latitud, ya sean instrumentos especiales para leer las posiciones de las estrellas o receptores que puedan triangular las señales transmi-

tidas desde emisoras de radio. De la misma forma, el sistema de información posicional del desarrollo requiere que las señales transmitidas sean interpretables por elementos de la célula.

Interpretación inicial de la información posicional

Como hemos descrito anteriormente, se pueden generar dos tipos muy distintos de señales posicionales. Sin embargo, ambas conducen al mismo resultado: un gradiente de concentración de uno o más factores de transcripción específicos entre las células del campo de desarrollo. En los ejemplos del desarrollo del eje A–P en *Drosophila*, con distintos mRNA localizados en puntos concretos, este resultado es consecuencia directa de que la propia información posicional consiste precisamente en gradientes de factores de transcripción (BCD y HB-M). Cuando la información posicional difunde a partir de fuentes extracelulares, el mismo resultado requiere varios pasos adicionales. Estos casos implican típicamente la formación de un gradiente de ligando proteico secretado que se une a un receptor de membrana de forma dependiente de su concentración. A su vez, la unión ligando-receptor activa una ruta de transducción de señal de forma proporcional al grado de activación del receptor. Finalmente, esta ruta de transducción de señal activa el factor o factores de transcripción adecuados en las células diana. Este proceso se observa punto por punto en el eje D–V de *Drosophila*, donde el gradiente extracelular de SPZ provoca una activación progresiva del factor de transcripción DL.

Dado que la información posicional conduce a un gradiente de actividades de factores de transcripción, esperaríamos lógicamente que los receptores de esa información fueran elementos reguladores (intensificadores y silenciadores) de aquellos genes cuyos productos proteicos deban empezar el proceso gradual de especificación del destino de la célula. Esto es exactamente lo que observamos. Los genes sobre los que actúan los factores de transcripción de los ejes A–P y D–V son genes de expresión cigótica conocidos globalmente como **genes cardinales** (Cuadro 23-3), porque son los primeros en responder a la información posicional de origen materno. Como ejemplo, podemos considerar los genes cardinales A–P. (La lógica del proceso que divide inicialmente el eje D–V en tres dominios, por la acción del gradiente de actividad del factor de transcripción DL, y luego en numerosas subdivisiones, es idéntica a la descrita para el eje A-P). Pero antes de hablar del establecimiento de destinos celulares a lo largo del eje A–P, debemos revisar algunos aspectos de la embriología de *Drosophila*.

Después de la fase embrionaria sincitial temprana, todos los núcleos somáticos migran a la superficie del embrión y se celularizan (Figs. 23-29 y 23-30*a*). Pocas horas más tarde, aparecen las primeras manifestaciones morfológicas de la segmentación. A las 10 horas de desarrollo, el embrión ya está dividido externamente en 14 segmentos desde el polo anterior al posterior: 3 segmentos de la cabeza, 3 torácicos y 8 abdominales (Fig. 23-30*b*). Ya en ese momento, cada segmento ha desarrollado un conjunto único de estructuras anatómicas, de acuerdo con su identidad y su función en la biología del animal. A las 12 horas, se produce la organogénesis. A las 15 horas, comienza a formarse el exoesqueleto de la larva, con sus pelos especializados y otras estructuras externas. Sólo 24 horas después del inicio del desarrollo, disparado por la fecundación, emerge de la cáscara del huevo una larva perfectamente formada (Fig. 23-30*c*). Cuando estudiamos

CUADRO 23-3. Ejemplos de genes del eje A-P en *Drosophila* que contribuyen a la formación del patrón

Símbolo del gen	Nombre del gen	Función de la proteína	Papel en el desarrollo temprano
hb-z	*hunchback-zygotic*	Factor de transcripción-proteína con dedos de Zn	Gen gap
Kr	*Krüppel*	Factor de transcripción-proteína con dedos de Zn	Gen gap
kni	*knirps*	Factor de transcripción-proteína tipo receptor de esteroides	Gen gap
eve	*even-skipped*	Factor de transcripción-proteína con homeodominio	Gen de la regla de los pares
ftz	*fushi tarazu*	Factor de transcripción-proteína con homeodominio	Gen de la regla de los pares
opa	*odd-paired*	Factor de transcripción-proteína con dedos de Zn	Gen de la regla de los pares
prd	*paired*	Factor de transcripción-proteína PHOX	Gen de la regla de los pares
en	*engrailed*	Factor de transcripción-proteína con homeodominio	Gen de polaridad segmental
ci	*cubitus interruptus*	Factor de transcripción-proteína con dedos de Zn	Gen de polaridad segmental
wg	*wingless*	Proteína de señalización WG	Gen de polaridad segmental
hh	*hedgehog*	Proteína de señalización HH	Gen de polaridad segmental
fu	*fused*	Quinasa de serina/treonina citoplásmica	Gen de polaridad segmental
ptc	*patched*	Proteína transmembrana	Gen de polaridad segmental
arm	*armadillo*	Proteína de conexión célula-célula	Gen de polaridad segmental
lab	*labial*	Factor de transcripción-proteína con homeodominio	Gen de identidad de segmentos
Dfd	*Deformed*	Factor de transcripción-proteína con homeodominio	Gen de identidad de segmentos
Antp	*Antennapedia*	Factor de transcripción-proteína con homeodominio	Gen de identidad de segmentos
Ubx	*Ultrabithorax*	Factor de transcripción-proteína con homeodominio	Gen de identidad de segmentos

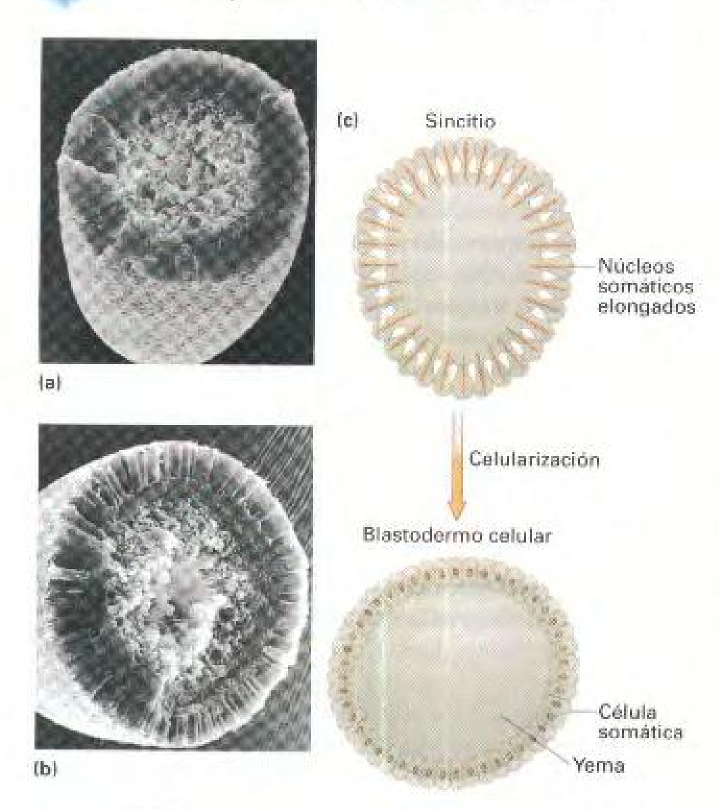


Figura 23-29. Celularización del embrión de *Drosophila*. El embrión forma inicialmente un sincitio; la celularización no se completa hasta que no hay unos 6000 núcleos. Las micrografías electrónicas de barrido corresponden a embriones sin cubierta. (a) Un embrión en estado de sincitio, fracturado de modo que se aprecien el citoplasma periférico común y la región central correspondiente a la yema. Las pequeñas protuberancias en la superficie del embrión son indicios de una celularización incipiente, en la cual la membrana plasmática comienza a invaginarse. (b) Un embrión en estado de blastodermo celular, fracturado de modo que se aprecien las células columnares que se han formado por invaginaciones de la membrana formadas entre los distintos núcleos elongados para dar lugar a unas 6000 células somáticas. (c) Esquema de los cambios que tienen lugar durante el proceso de celularización. (Adaptado de F.R. Turner y A. P. Mahowald, «Scanning Electron Microscopy of *Drosophila* Embryogenesis», *Developmental Biology* 50, 1976, 95.)

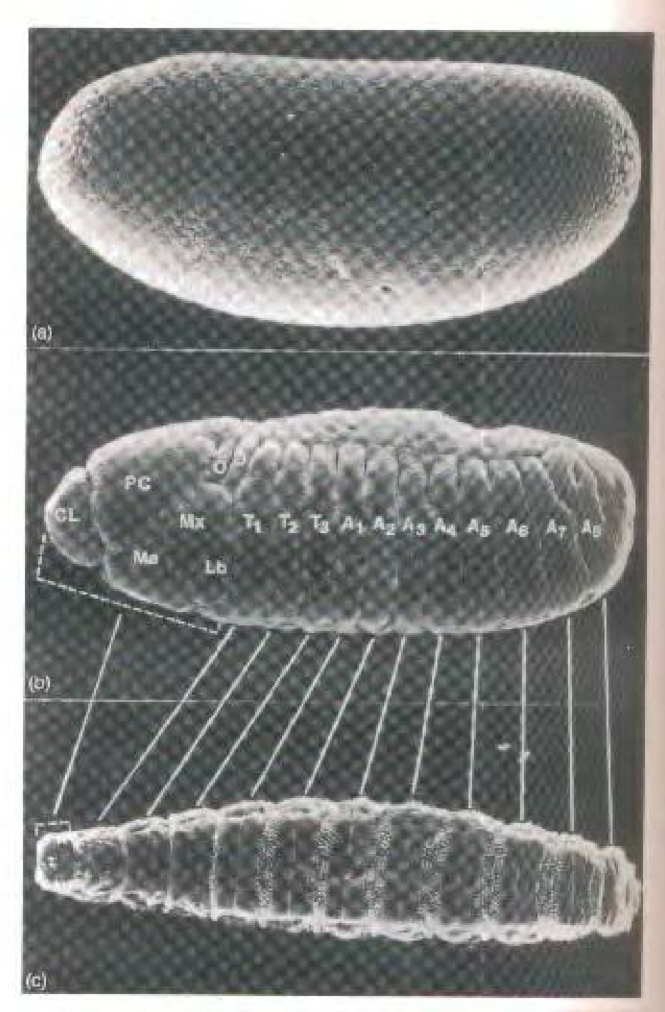


Figura 23-30. Microfotografías electrónicas de barrido de (a) un embrión de *Drosophila* de 3 horas, (b) un embrión de 10 horas y (c) una larva recién eclosionada. Puede verse que, a las 10 horas, la segmentación del embrión es claramente apreciable. Las líneas han sido dibujadas para resaltar que la identidad de los segmentos a lo largo del eje A-P ya está definida desde estadios tempranos del desarrollo. Las abreviaturas indican los diferentes segmentos de la cabeza (CL, PC, O, D, Mx, Ml, Lb), del tórax (T1 a T3) y del abdomen (A1 a A8). (T. C. Kaufman y F. R. Turner, Indiana University)

el patrón A–P, es de especial interés que la disposición en cada segmento de espículas, pelos y otras estructuras sensoriales del exoesqueleto de la larva hacen distinto y reconocible a cada segmento. Ahora, volvamos a considerar los genes cardinales A-P.

Los genes cardinales A–P se conocen también como genes gap («espacio en blanco» o «hueco» en inglés), porque las larvas mutantes en esos genes carecen de una serie secuencial de segmentos, lo que produce un «hueco» en el patrón de segmentación normal de la larva (en la Fig. 23-31 pueden verse los fenotipos provocados por mutaciones en dos genes gap, *Krüppel* y *knirps*). El factor de transcripción BCD, HB–M, o ambos, se unen a elementos intensificadores de los promotores de los genes gap regulando así su transcripción. Por ejemplo, la transcripción del gen *Krüppel* (*Kr*) se reprime por niveles altos de BCD, pero se activa por niveles bajos de BCD y HB–M. Por el contrario, el gen *knirps* (*kni*) se reprime por la proteína BCD, a cualquier concentración, pero requiere niveles bajos del factor de transcripción HB-M para expresarse. Las propiedades de estos intensificadores y promotores hacen que el gen *kni* se exprese en segmentos más posteriores que *Kr* (Fig. 23-32*a*). Gracias a promotores con sensibilidad diferencial a las concentraciones de los factores de transcripción del sistema de información posicional A-P, los genes gap se expresan en una serie de dominios distintos y, como consecuencia, estos dominios se convierten en campos de desarrollo. Es decir, las células de los distintos dominios quedan comprometidas a diferentes destinos A–P.

El compromiso de los dominios a adoptar diferentes destinos se debe a que cada gen gap cifra un factor de transcripción distinto y, por lo tanto, puede regular a un conjunto de genes diana diferentes que actúan después para definir el destino de los segmentos A-P.

La asignación de destinos más específicos mediante interacciones de factores de transcripción

El patrón de expresión de los genes gap divide al eje A-P en varios dominios. Sin embargo, la expresión de los genes gap no

Gap

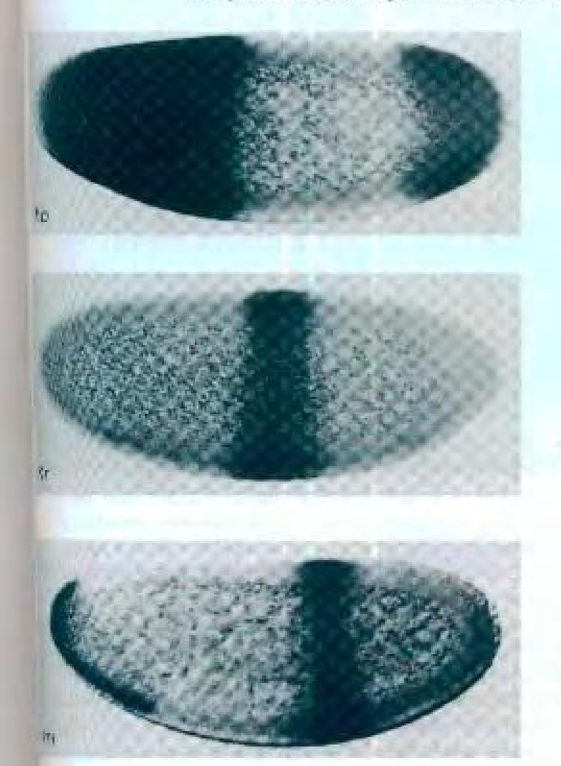
Regla de los pares

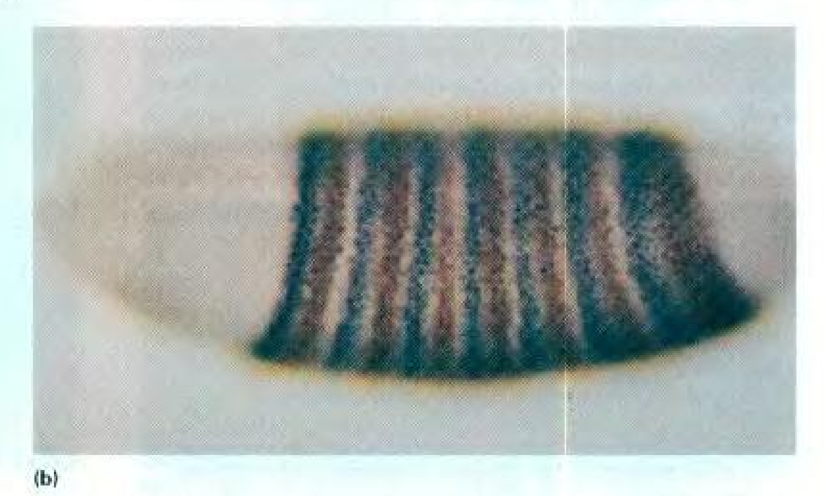
Polaridad segmental

Krüppel *even-skipped* *odd-skipped* *gooseberry*

knirps *paired* *runt* *patched*

Figura 23-31. Esquema de los fenotipos mutantes de larvas con mutaciones representativas en tres tipos de genes de expresión cigótica que controlan el número de segmentos en *Drosophila*. Los anillos de dentículos, mostrados como trapezoides rojos, son franjas de material denso, repetidas de modo segmental, presentes en la cara ventral del exoesqueleto de la larva. Los límites de cada segmento se representan con líneas de puntos. A la izquierda, las regiones rosas indican, sobre el esquema de una larva silvestre, los dominios A–P que faltan en cada mutante. A la derecha se representan los fenotipos mutantes resultantes.





(b)

Figura 23-32. Microfotografías que muestran los patrones de expresión temprana en el embrión de los genes gap y de la regla de los pares. (a) Patrones de expresión de las proteínas de tres genes gap, *hb-z*, *Kr* y *kni*, en el blastodermo temprano. (b) Patrones de expresión de las proteínas de dos genes de la regla de los pares, *ftz* (en gris) y *eve* (en marrón), en el blastodermo tardío. Puede verse la expresión localizada de los genes gap en contraste con el patrón reiterativo de expresión de los genes de la regla de los pares. (Parte a de M. Hulskamp y D. Tautz, «Gap Genes and Gradients: The Logic Behind the Gaps,» *Bioessays* 13, 1991, 261. Parte b de Peter Lawrence, *The Making of a Fly*. Copyright © 1992 de Blackwell Scientific Publications.)

es lo suficientemente precisa como para establecer todos los destinos celulares A–P necesarios. Más adelante, cuando el embrión sincitial completa su celularización, el final de la fase de expresión de los genes gap coincide exactamente con el comienzo de una mayor especialización de los destinos celulares. En este momento, el citoplasma de cada célula contiene una concentración particular de una o quizás dos proteínas gap adyacentes. Prácticamente todas las decisiones siguientes están dirigidas por las proteínas gap A–P que se encuentran en el núcleo de cada célula concreta.

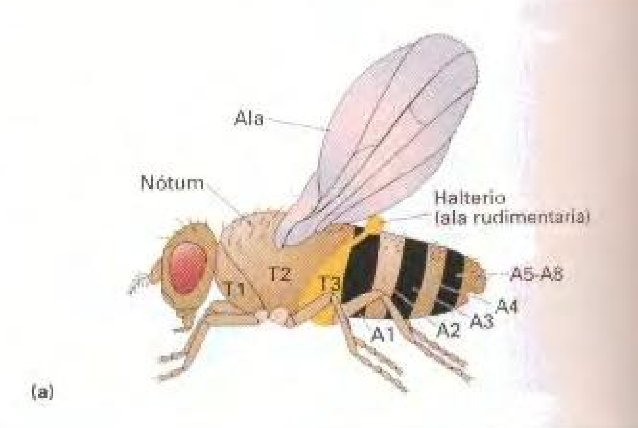
Una vez que actúan los genes gap, la ruta de desarrollo A–P se bifurca. Cada una de las dos ramas ejemplifica cómo se refinan los patrones de desarrollo. Una rama establece el número correcto de segmentos. La otra asigna a cada segmento su identidad propia. (Estas distintas identidades se manifiestan en la distribución de espículas y pelos característica de cada segmento, como ya comentamos anteriormente). La existencia de dos ramas significa que los factores de transcripción gap regulan dos grupos distintos de genes diana.

Veamos primero, brevemente, el establecimiento del número de segmentos. (En la Fig. 23-31 se describen los fenotipos mutantes asociados a las distintas clases de genes que controlan el número de segmentos). Los genes gap activan una serie de genes secundarios del patrón A–P, denominados **genes de la regla de los pares**, en un patrón repetitivo de siete bandas (Fig. 23-32*b*). Hay varios genes de la regla de los pares distintos, cada uno de los cuales se expresa en un patrón de bandas ligeramente desplazadas. Además, existe una jerarquía entre ellos. Algunos, llamados genes de la regla de los pares primarios, son regulados directamente por los genes gap, en tanto que otros son activados por los productos de los genes de la regla de los pares primarios, que también son factores de transcripción. Los genes de la regla de los pares actúan de un modo combinatorial (en cada célula se expresan varios de ellos) para regular la transcripción de los genes de polaridad segmental, que se expresan en patrones desplazados de 14 bandas. Así pues, la jerarquía de la regulación de los factores de transcripción se extiende desde el sistema de información posicional hasta el patrón repetitivo de expresión de los genes de polaridad segmental. Los productos de estos últimos genes permiten entonces la formación de los 14 segmentos y definen las bandas de células individuales A–P dentro de cada segmento.

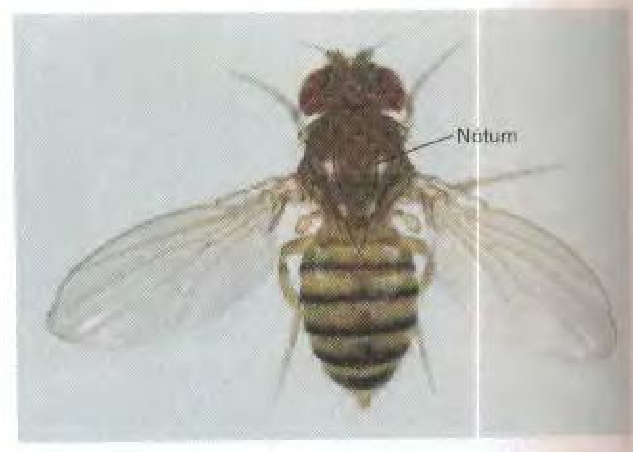
COROLARIO

La información posicional, a través de una cascada jerárquica de patrones de regulación de factores de transcripción, conduce a la aparición del número correcto de segmentos. En la lectura de la información posicional, los factores de transcripción actúan en combinación unos con otros para generar el número apropiado de destinos segmentales.

¿Cómo pueden las proteínas gap, que se expresan de forma asimétrica, activar a los genes de la regla de los pares en ese patrón repetitivo? La clave está en que los elementos reguladores de los genes de la regla de los pares primarios son muy complejos. En un gen primario como *eve* (*even-skipped*), elementos intensificadores diferentes regulan su activación en cada banda. El intensificador de *eve* en la banda 1 es activado por altos nive-



(a)



(b)


(c)

Figura 23-33. Transformación homeótica del tercer segmento torácico (T3) de *Drosophila* en un segundo segmento torácico (T2) adicional. (a) Esquema que muestra los segmentos torácicos y abdominales normales: puede verse la estructura en forma de ala rudimentaria que aparece en T3. La mayor parte del tórax de la mosca, incluidas las alas y la parte dorsal del tórax, se forma a partir del T2. (b) Una mosca silvestre, con un T2 y un T3. (c) El mutante *bithorax*, un triple homocigoto mutante, presenta la transformación completa del T3 en otro segmento T2. Pueden verse el segundo tórax dorsal y el segundo par de alas (estructuras T2) y la ausencia de halterios (estructuras T3). (De E. B. Lewis, «A Gene Complex Controlling Segmentation in *Drosophila*», *Nature* 276, 1978, 565. Fotografías cedidas por E. B. Lewis. Reproducido con permiso de *Nature*. Copyright © 1978 de Macmillan Journals Ltd.).

es del factor de transcripción gap HB–Z, el de la banda 2 por niveles bajos de HB–Z y niveles altos del factor de transcripción gap KR, y así sucesivamente.

COROLARIO

La complejidad de los elementos reguladores de los genes de la regla de los pares primarios convierte un patrón de expresión asimétrico (el de los genes gap) en uno repetitivo.

Ahora, hablemos brevemente del establecimiento de la identidad de los segmentos. Los genes gap actúan también sobre una serie de genes localizados en los **complejos de genes homeóticos**. Se denominan complejos de genes porque se trata de varios genes agrupados, situados unos junto a otros en el DNA. *Drosophila* posee dos agrupaciones de genes homeóticos. ANT–C (el complejo *Antennapedia*) es responsable en gran medida de la identidad de los segmentos de la cabeza y el tórax anterior, mientras que BX–C (el complejo *bithorax*) es responsable de la identidad de los segmentos del tórax posterior y el abdomen.

Se denomina **homeosis** a la conversión de una parte del cuerpo en otra. Tres ejemplos de fenotipos de conversión de partes del cuerpo debidos a mutaciones en genes homeóticos son: (1) las mutaciones *bithorax*, de pérdida de función, que producen la conversión completa del tercer segmento torácico (T3) en el segundo segmento torácico (T2), generando moscas con cuatro alas en vez de las dos normales (Fig. 23-33); (2) las mutaciones dominantes de ganancia de función *Tab* descritas en el Capítulo 11 (Figs. 11-34 y 11-35), que transforman parte del segmento T2 del adulto en el sexto segmento abdominal (A6), y (3) la mutación dominante de ganancia de función *Antennapedia* (*Ant*), que transforma las antenas en patas (como se puede ver en la fotografía de portada de este capítulo). En cada uno de estos casos, podemos observar que el número de segmentos del animal permanece invariable; el *único* cambio afecta a la identidad de los segmentos. Estudiando estas mutaciones homeóticas hemos aprendido mucho sobre cómo se establece la identidad de los segmentos.

Las proteínas gap, expresadas en distintos dominios, activan inicialmente la expresión de los genes homeóticos diana en una serie de zonas solapadas (Fig. 23-34). Los genes homeóticos cifran proteínas con homeodominio, una clase particular de factores de transcripción. Estas **proteínas con homeodominio** actúan sobre los elementos reguladores de los otros genes homeóticos de manera específica y, como consecuencia, el patrón de expresión de los genes homeóticos se hace mutuamente exclusivo. (Hablaremos sobre las relaciones estructurales y funcionales dentro de los complejos de genes homeóticos más tarde, en el contexto de la evolución de los mecanismos de desarrollo). Estas proteínas con homeodominio también regulan genes diana que actúan a continuación y son responsables de conferir identidades funcionales específicas a distintas regiones de cada segmento.

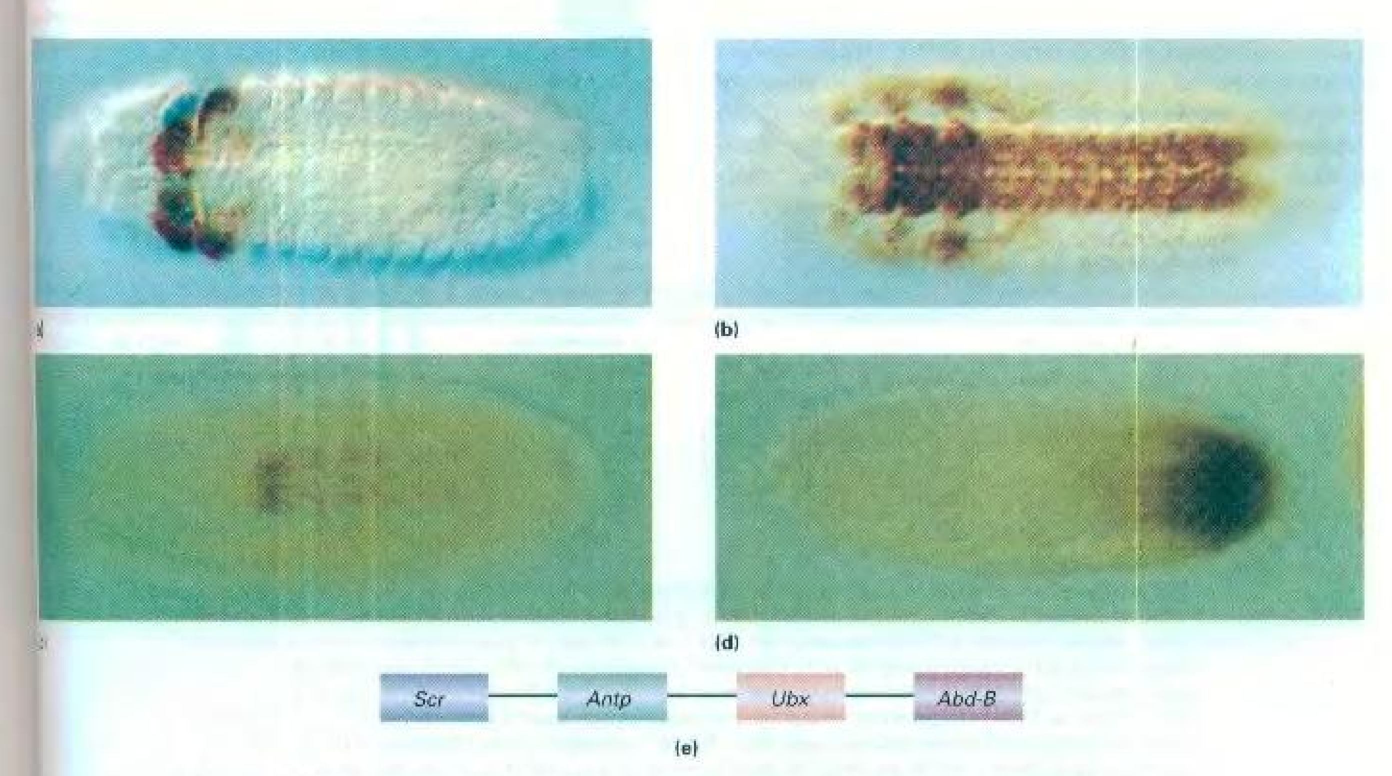


Figura 23-34. Microfotografías de embriones de *Drosophila* que muestran los patrones de expresión de proteínas cifradas en genes homeóticos. (a) SCR; (b) ANTP; (c) UBX; (d) ABD-B. Puede verse que los límites anteriores de la expresión de los genes homeóticos se ordenan desde SCR (más anterior) a ANTP, UBX y ABD-B (más posterior). (e) Esta ordenación coincide con la disposición lineal de los genes correspondientes a lo largo del cromosoma 3. (Partes a y b de T. C. Kaufman, Indiana University. Partes c y d de S. Celniker y E. B. Lewis, California Institute of Technology.)

COROLARIO

La identidad de los segmentos se establece mediante la expresión asimétrica de los genes gap que se traduce en un patrón de expresión asimétrico de los genes homeóticos.

Una cascada de hechos reguladores

Como ya hemos visto, el establecimiento del patrón A–P en el embrión de *Drosophila* ocurre mediante la activación secuencial de pasos reguladores. La información posicional establece diferentes concentraciones de factores de transcripción a lo largo del eje A–P, generando el patrón de expresión adecuado de los genes diana reguladores para subdividir cada vez más finamente el embrión, fijándose finalmente tanto el número de segmentos como su identidad (Fig. 23-35).

Otros aspectos de la generación de patrones

Los principios enunciados en las secciones precedentes establec-

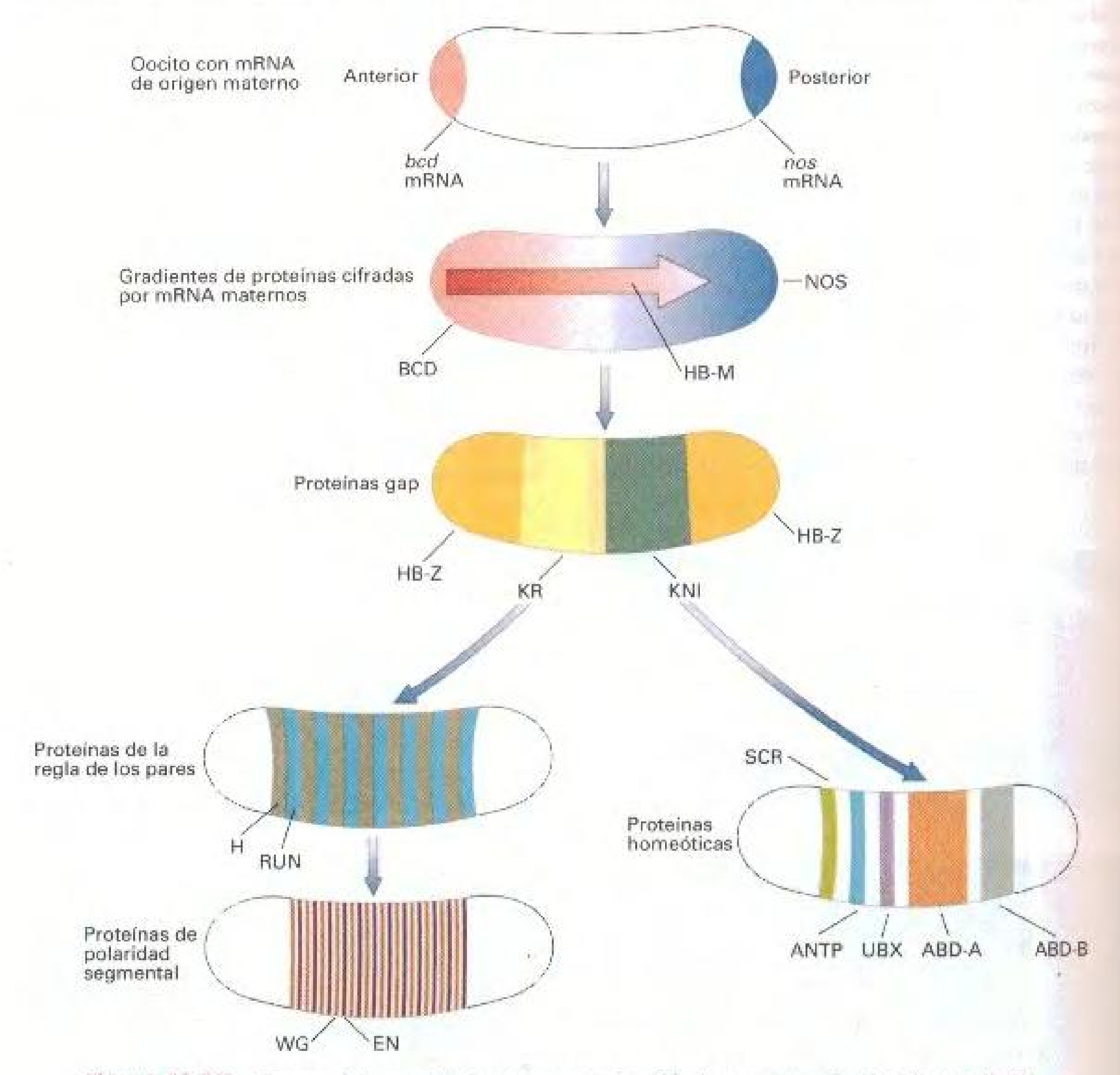
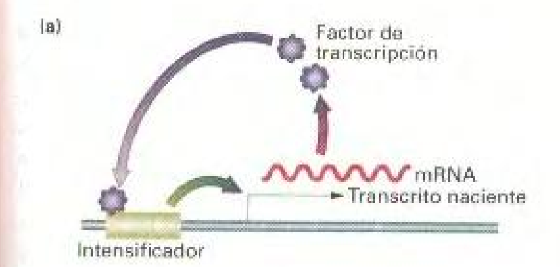


Figura 23-35. Esquema de la cascada jerárquica que activa los elementos que generan el patrón de segmentación A-P de *Drosophila*. Los mRNA *bcd* y *nos*, de origen materno, se localizan en los polos anterior y posterior, respectivamente. En los primeros momentos de la embriogénesis, estos mRNA son traducidos y se genera un gradiente pronunciado anteroposterior del factor de transcripción BCD. El gradiente posteroanterior de NOS inhibe la traducción del mRNA de *hb-m*, generando de este modo un gradiente suave anteroposterior del factor de transcripción HB–M (indicado por una flecha). Los genes gap, que son los genes cardinales A–P, son activados en diferentes partes del embrión en respuesta a los gradientes anteroposteriores de BCD y HB–M. (La banda de expresión posterior de HB–Z genera diversos órganos internos, pero no segmentos). El número correcto de segmentos se especifica mediante la activación de los genes de la regla de los pares en un patrón «rayas de cebra» en respuesta a los factores de transcripción cifrados en los genes gap. Los genes de polaridad segmental se activan a continuación en respuesta a las actividades de varias proteínas de la regla de los pares, lo que finalmente produce una mayor resolución de la organización dentro de cada segmento. La correcta identidad de los segmentos se determina por la expresión de los genes homeóticos regulados directamente por los factores de transcripción gap. (Adaptado de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2. ed. Copyright © 1992 de James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkovski y Mark Zoller.)



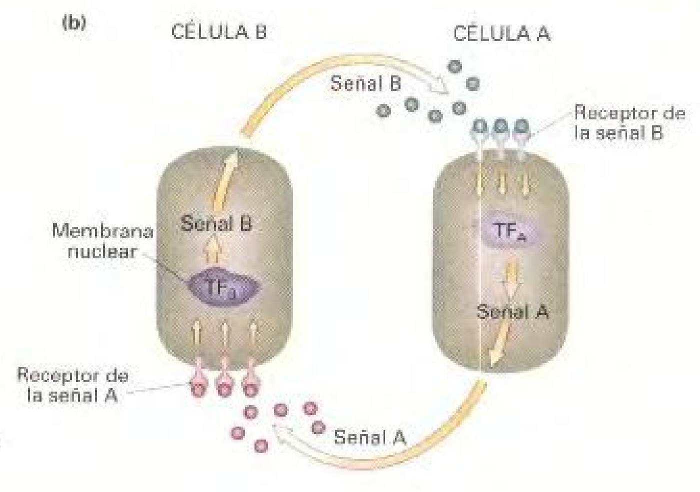


Figura 23-36. Dos tipos de bucles de retroalimentación positiva para mantener el nivel de actividad de factores de transcripción que determinan destinos celulares. (a) El factor de transcripción se une a un intensificador de su propio gen, manteniendo su transcripción. (b) Cada célula adyacente emite una señal (diferente en cada célula) que activa receptores, rutas de transducción de señal y la expresión de factores de transcripción (TF) en la otra célula. Esta activación conduce a un bucle de retroalimentación positiva mutua entre las dos células.

en los destinos iniciales, pero es necesario que actúen mecanismos adicionales que aseguren que todos los aspectos de la formación de patrones se desarrollan por completo. Trataremos algunos de estos mecanismos en esta sección.

Sistemas de memorización para recordar el destino celular

Con frecuencia, es necesario que las decisiones de formación de patrones se mantengan en un linaje celular durante toda la vida del organismo. Éste es ciertamente el caso en los patrones de expresión de los genes de polaridad segmental y de los genes homeóticos, fijado por los sistemas de generación del patrón A–P. Un mantenimiento de este tipo se consigue mediante bucles autorreguladores intracelulares y extracelulares (Fig. 23-36).

En muchos tejidos, se establece un bucle autorregulador positivo en el que la proteína homeótica presente en ese tejido se une a elementos intensificadores de su propio gen, asegurando así que esa proteína homeótica seguirá produciéndose de forma continua (Fig. 23-36*a*). (Este fenómeno recuerda al bucle de retroalimentación positiva del procesamiento de *Sxl* en la ruta de desarrollo del sexo femenino discutida anteriormente en este capítulo.)

Otra posible solución requiere interacciones intercelulares (Fig. 23-36*b*). Veamos un ejemplo en los genes de polaridad segmental: células adyacentes expresan las proteínas WG y EN, respectivamente. EN es un factor de transcripción que activa la expresión de la proteína HH en las mismas células. (En el Cuadro 23-4 se da más información sobre estas proteínas y los genes que las cifran). HH es una proteína secretada que activa un receptor específico en la célula que expresa WG, iniciando una cascada de

CUADRO 23-4. Ejemplos de genes conservados evolutivamente que contribuyen a la formación de patrones en *Drosophila*

Símbolo del gen de *Drosophila*	Nombre del gen de *Drosophila*	Equivalente en *mamíferos*	Función de la proteína	Papel en el desarrollo temprano
dl	*dorsal*	$NF_{\kappa}B$	Factor de transcripción DL	Factor de transcripción D–V
cact	*cactus*	$I_{\kappa}B$	Unión a la proteína DL en el citoplasma	Regulación de la expresión de DL
spz	*spaetzle*	IL-1	Señal: ligando SPZ	Crear información posicional D–V
Tl	*Toll*	Receptor de IL-1	Receptor del ligando SPZ	Regulación de la expresión de DL
snk	*snake*	Varios	Proteasa de serina	Activación de la proteína SPZ
dpp	*decapentaplegic*	BMP2, BMP4	Señal: ligando DPP	Gen cardinal para el ectodermo dorsal
sax	*saxophone*		Receptor quinasas de serina/treonina del ligando DPP	Contribuyen a la formación del patrón del ectodermo dorsal
tkv	*thick veins*	BRK		
pnt	*punt*			
sog	*short gastrulation*	Cordina	Señal: ligando SOG	Contribuye a generar patrones en el ectodermo
spi	*spitz*	TGF-α	Señal: ligando SPI	Regulación secundaria del ectodermo ventral
en	*engrailed*	En1, En2	Proteína con homeodominio	Gen de polaridad segmental
hh	*hedgehog*	Sonic hedgehog	Señal: ligando HH	Gen de polaridad segmental
wg	*wing*	Wnt1, Wnt2, etc.	Señal: ligando WG	Gen de polaridad segmental
arm	*armadillo*	β-Catenina	Transducción de la señal WG	Gen de polaridad segmental

Nota: otras muchas conservaciones no se indican en el cuadro.

transducción de señal que, finalmente, activa, entre otras cosas, la expresión del gen *wg* (*wingless*) y, consecuentemente, la producción de más proteína WG. Ésta, a su vez, es también una proteína secretada que activa la expresión de *en* (*engrailed*) en la célula adyacente, induciendo la producción de más proteína EN en ésta.

COROLARIO

Una vez establecido el destino de una célula, éste debe ser recordado.

Cómo asegurar que se han asignado todos los destinos: decisiones en comité

En última instancia, para que un campo de desarrollo madure y se transforme en un órgano o tejido funcional, las células deben comprometerse, en el número y posiciones adecuadas, a la gama completa de destinos que son necesarios. Para ello, se establecen interacciones célula-célula que aseguran que tal cosa ocurre. Existen dos tipos de interacciones principales, y ambas operan durante el desarrollo de la vulva, la apertura al exterior del tracto reproductor del nematodo *C. elegans* (Fig. 23-37). Uno consiste en que una célula sea capaz de inducir a una o varias de sus células vecinas para que adopten un determinado destino en el desarrollo, y el otro en que una célula sea capaz de impedir que las células vecinas adopten su mismo destino.

El desarrollo de la vulva se ha estudiado con detalle mediante el análisis de mutantes que bien carecen de vulva o bien tienen demasiadas. En el hipodermo (la pared corporal del gusano), hay varias células potencialmente capaces de generar ciertas partes de la vulva. Para formar una vulva completa, una de las células debe convertirse en la célula primaria y otras dos deben convertirse en células secundarias (Fig. 23-38*a*); las demás se convierten en células terciarias que pasan a formar parte del hipodermo circundante (Fig. 23-38*b*).

Inicialmente, todas esas células pueden adoptar cualquiera de los destinos citados y por ello se denominan **grupo de equivalencia**, lo que, en esencia, es un campo de desarrollo. La clave para repartir los distintos papeles entre las células es otra célula individual, llamada *célula ancla*, que está colocada encima de las células del grupo de equivalencia (Fig. 23-38*c*). La célula ancla secreta un ligando polipeptídico que se une a un receptor quinasa de tirosina (RTK) presente en todas las células del grupo. Sólo en la célula que recibe la señal con mayor intensidad (la célula del grupo de equivalencia más cercana a la célula ancla) se activa la ruta de transducción de señal a niveles suficientes para activar al factor de transcripción necesario para que esta célula se convierta en célula primaria de la vulva (Fig. 23-38*d*). Por tanto, podemos decir que la célula ancla ejerce una **interacción inductiva** que compromete a una célula al destino de célula primaria de la vulva.

Una vez que ha definido su destino, la célula primaria de la vulva envía otra señal paracrina a sus vecinas más próximas del grupo de equivalencia, inhibiendo en ellas una interpretación similar de la señal de la célula ancla que las llevaría al papel primario. Este proceso de **inhibición lateral** hace que las células vecinas adopten el destino secundario. Las restantes células del grupo de equivalencia adoptan el destino terciario, integrándose al hipodermo que rodea la vulva. Para cada uno de los tres tipos celulares en los que puede convertirse el grupo de equivalencia hay toda una serie específica de factores de transcripción que se activan y que caracterizan el estado de la célula: primario, secundario o terciario. Así pues, mediante una serie de señales paracrinas intercelulares, un grupo de células equivalentes puede desarrollarse en los tres tipos necesarios de células.

COROLARIO

El reparto de los destinos celulares puede efectuarse mediante una combinación de acciones inductivas y de inhibición lateral entre las células.

Las rutas de desarrollo se componen combinando módulos intercambiables

Se están investigando muchas rutas de desarrollo en diferentes organismos modelo. De estos estudios, se deduce claramente

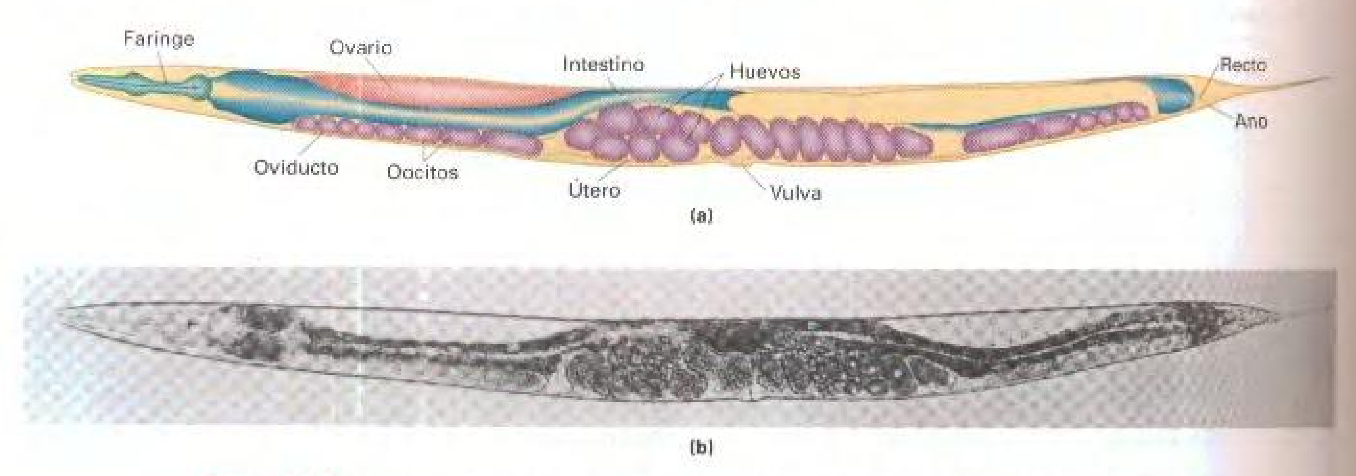


Figura 23-37. Forma adulta de *Caenorhabditis elegans*. Dibujo (a) y microfotografía (b) de un adulto hermafrodita, donde se muestran diversos órganos y núcleos fácilmente identificables por su posición. Puede verse la localización de la vulva, hacia la mitad del eje anteroposterior del gusano. (De J. E. Sulston y H. R. Horvitz, «Post-embryonic Cell Lineages of the Nematode, *Caenorhabditis elegans*», *Developmental Biology* 56, 1977, 111.)

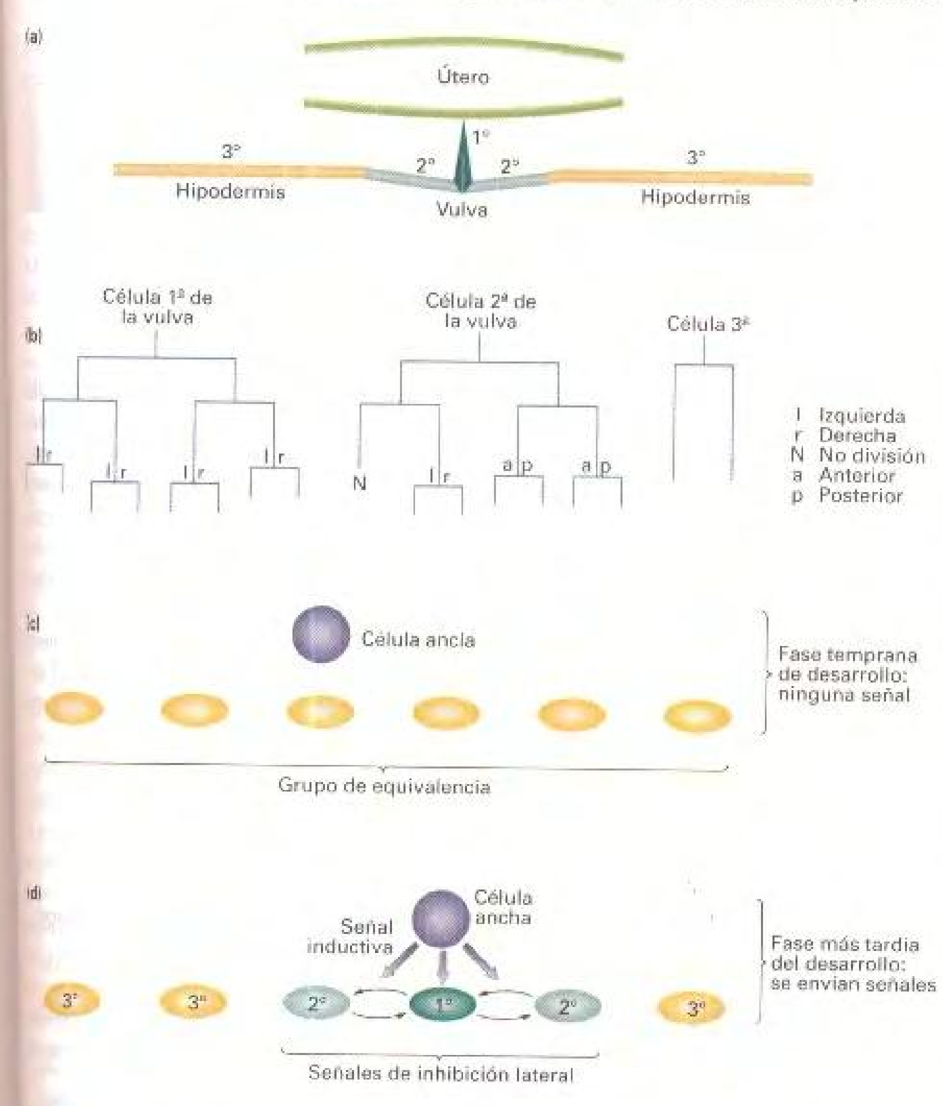


Figura 23-38. Formación de la vulva de *C. elegans* a partir del grupo de equivalencia mediante interacciones célula-célula. (a) Partes de la anatomía de la vulva que ocupan los descendientes de las células del grupo de equivalencia. (b) Los tipos celulares primarios, secundarios y terciarios se distinguen por el patrón de división celular que siguen. (c) En las fases tempranas del desarrollo, la célula ancla no emite ninguna señal, y todas las células del grupo de equivalencia se encuentran, por defecto, en el estado de desarrollo terciario. (d) Más tarde, la célula ancla emite una señal que activa una cascada de transducción de señal dependiente de un receptor quinasa de tirosina. La célula del grupo de equivalencia más próxima a la célula ancla recibe la señal más fuerte y se convierte en célula primaria de la vulva. Entonces, envía señales de inhibición lateral a las células vecinas impidiendo que adopten también el destino de célula primaria y dirigiéndolas de ese modo a su desarrollo como células secundarias de la vulva. (Parte b de H. R. Horvitz y P. W. Sternberg, «Multiple Intercellular Signalling Systems Control the Development of the *Caenorhabditis elegans* Vulva». *Trends in Genetics* 7, 1991, 366.)

que los elementos de las rutas se usan una y otra vez durante el desarrollo de una especie determinada. En realidad, hay pocos ejemplos de un producto génico responsable de la generación de patrones que participe en una única decisión de desarrollo. Al contrario, piezas y tramos de rutas se combinan de distintas formas para producir resultados diferentes. Parece como si, cuando en la evolución aparece una solución efectiva a un problema particular del desarrollo, esa misma solución se aplicara para resolver muchos otros problemas. Podemos pensar en este fenómeno como en el equivalente molecular a la idea evolutiva general de que las nuevas estructuras aparecen por modificaciones y adaptaciones de otras preexistentes, más que por invenciones completamente novedosas.

COROLARIO

Los elementos de una ruta de desarrollo se emplean también en muchas otras vías, pero mezclándolos y encajándolos de diversas formas, como si fueran módulos reutilizables.

Típicamente, una parte de una ruta tiene varias «entradas», relacionadas con las señales que la regulan, y a veces las «salidas»

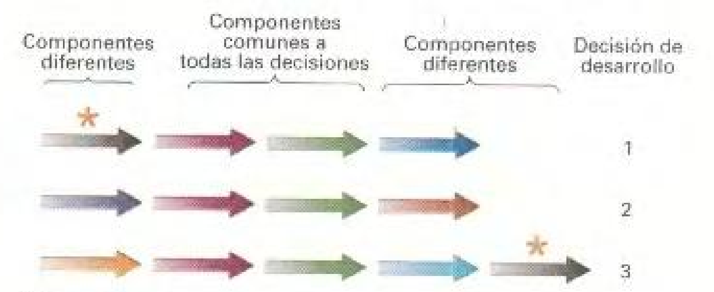


Figura 23-39. Se pueden adoptar diferentes decisiones de desarrollo combinando componentes de rutas distintas. Cada flecha coloreada representa un componente distinto. Las rutas se ensamblan utilizando varias combinaciones diferentes para obtener distintas decisiones de desarrollo, bien en diferentes linajes celulares o bien en el mismo linaje pero en diferentes estadios del desarrollo. Algunos de los componentes son comunes a varias rutas; otros son específicos de un proceso determinado. También es posible que algunos componentes (indicados con un asterisco) se utilicen en procesos de toma de decisiones distintos, ocupando además posiciones diferentes en cada proceso.

son también distintas (Fig. 23-39). Como ejemplo de diferentes entradas, el gen *dpp* (*decapentaplegic*), cuya compleja estructura se describió en el Capítulo 11, es regulado por el factor de transcripción DL durante la formación del patrón D–V en el embrión, mientras que, durante el desarrollo del mesodermo visceral, es regulado por el factor de transcripción UBX. Como ejemplo de diferentes salidas, hemos visto como, para mantener la adecuada expresión de los genes de polaridad segmental y los correspondientes destinos celulares, el componente EN–HH del bucle de retroalimentación positiva activa la producción de WG en las células adyacentes. Durante el desarrollo larvario del ala del adulto de *Drosophila*, el mismo componente EN-HH activa la secreción de una proteína señal distinta —DPP— en las células adyacentes a las que expresan EN–HH. Como otro ejemplo de diferentes salidas, la ruta de trasducción de la señal DPP conduce a la activación de varios factores de transcripción completamente distintos, que participan en la generación del patrón D–V, el desarrollo del ala y el desarrollo de mesodermo visceral. Ciertamente, la compleja estructura de los elementos reguladores, común a muchos genes eucarióticos superiores, es probablemente la consecuencia necesaria de tener que responder a muchas señales distintas específicas de cada tejido.

COROLARIO

Las diferencias en el contexto de desarrollo de los distintos linajes celulares —es decir, el juego de factores de transcripción activos en esas células— permiten que un determinado circuito de desarrollo responda a diferentes estímulos y dé lugar a respuestas distintas.

Los numerosos paralelismos entre la formación de patrones en insectos y vertebrados

¿Hasta qué punto son universales los principios del desarrollo descubiertos en *Drosophila*? Hasta hace poco, el tipo de análisis genético posible en *Drosophila* no era practicable en la mayoría de los otros organismos, al menos sin una enorme inversión para desarrollar herramientas genéticas comparables. Sin embargo, en los últimos años, la tecnología del DNA recombinante ha desarrollado instrumentos que permiten plantearse la generalidad de los descubrimientos realizados en *Drosophila*.

Consideremos el ejemplo de los genes homeóticos. Con el descubrimiento de que hay muchos genes homeóticos en el genoma de *Drosophila*, se pudo aprovechar la similitud entre sus

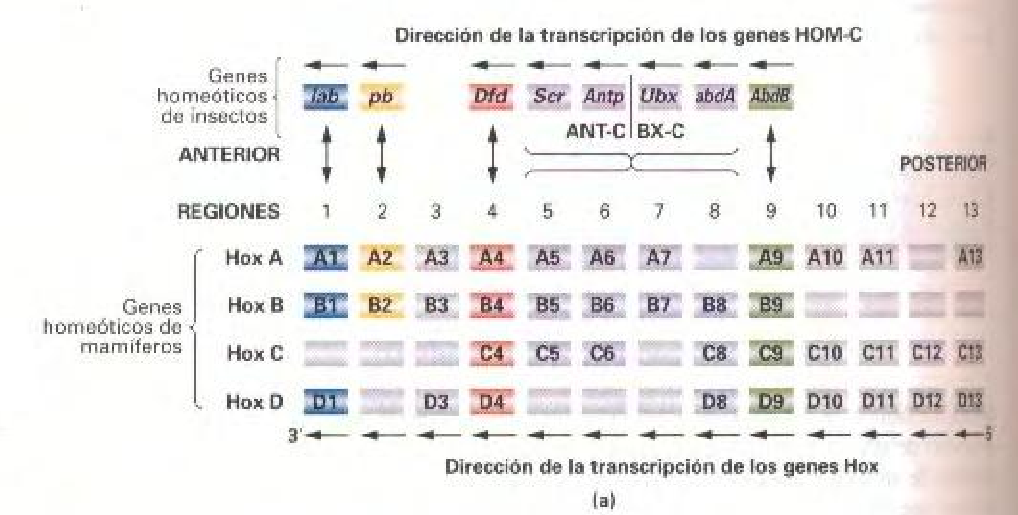


Figura 23-40. Comparación de la estructura y la función de los genes homeóticos de insectos y de mamíferos. (a) Anatomía comparada de los complejos de genes HOM-C y Hox. Los genes del HOM-C se muestran en la parte superior. Cada uno de los cuatro complejos Hox parálogos (véase el texto) se encuentra en un cromosoma diferente. Los genes que se muestran en un mismo color son aquellos relacionados entre sí en mayor grado, tanto en estructura como en función. (b) Dominios de expresión y regiones de los embriones de *Drosophila* y de ratón que requieren los diferentes genes HOM-C y Hox. El significado de los colores es equivalente al de la parte a. Puede verse que el orden de los dominios en los dos embriones es el mismo. (Adaptado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.I. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995, Scientific American Books.)

CUADRO 24-2. Frecuencias de los tipos gaméticos del sistema MNS en varias poblaciones humanas

	TIPO GAMÉTICO				HETEROCIGOSIDAD (*H*)	
Población	*M S*	*M s*	*N S*	*N s*	A partir de gametos	A partir de alelos
Ainu	0.024	0.381	0.247	0.348	0.672	0.438
Ugandesa	0.134	0.357	0.071	0.438	0.658	0.412
Pakistaní	0.177	0.405	0.127	0.291	0.704	0.455
Inglesa	0.247	0.283	0.080	0.290	0.700	0.469
Navajos	0.185	0.702	0.062	0.051	0.467	0.286

Fuente: A. E. Mourant, *The Distribution of the Human Blood Groups*. Blackwell Scientific, 1954.

secuencia de aminoácidos o incluso variaciones en regiones que no se traducen). Todas las especies examinadas hasta el momento muestran una variación genética considerable, o **polimorfismo**, reflejada en uno o más niveles del fenotipo, tanto entre poblaciones, como dentro de una población o en ambos casos. Se dice de un gen o de un carácter fenotípico que es *polimórfico* si hay más de una forma del gen o del carácter en la población. La variación genética que podría ser la base del cambio evolutivo es ubicua. El objetivo de los genetistas de poblaciones es describir cuantitativamente esa variación y proponer una teoría del cambio evolutivo que pueda utilizar estas observaciones para realizar predicciones.

Es imposible en este texto proporcionar una visión adecuada de la inmensa riqueza de la variación genética que existe en las especies. Consideremos sólo unos pocos ejemplos de las diferentes clases de variación mendeliana para dar una idea de la diversidad genética de una especie. Cada uno de estos ejemplos puede multiplicarse muchas veces si consideramos otras especies u otros caracteres.

Variación morfológica. El caparazón del caracol terrestre *Cepaea nemoralis* puede ser rosa o amarillo, dependiendo de dos alelos del mismo locus, donde el color rosa es dominante sobre el amarillo. Además, el caparazón puede mostrar un dibujo a bandas o no mostrarlo (Fig. 24-1) como resultado de la segregación en otro locus, siendo el carácter «sin bandas» dominante sobre el carácter «con bandas». En el Cuadro 24-3 se muestra la variación respecto a estos dos loci en varias colonias europeas de este caracol. Estas poblaciones también muestran polimorfismo respecto al número de bandas y la altura de los caparazones, pero se trata en estos casos de caracteres con una base genética muy compleja.



Figura 24-1. Patrones en el caparazón del caracol *Cepaea nemoralis*: (a) amarillo con bandas; (b) rosa y sin bandas.

CUADRO 24-3. Frecuencias de caracoles (*Cepaea nemoralis*) con distintos colores y patrones de bandas en el caparazón, en tres poblaciones de Francia

	AMARILLO		ROSA	
Población	Con bandas	Sin bandas	Con bandas	Sin bandas
Guyancourt	0.440	0.040	0.337	0.183
Lonchez	0.196	0.145	0.564	0.095
Peyresourde	0.175	0.662	0.100	0.062

Fuente: Maxime Lamotte, *Bulletin Biologique de France et Belgique* 35 (suppl.), 1951.

Ejemplos de variación morfológica natural dentro del mundo vegetal los podemos encontrar en las especies *Plectritis* (véase la Fig. 1-14), *Collinsia* (Mary ojos azules, pág. 58) y el trébol (véase la Fig. 4-5).

Polimorfismo cromosómico. Aunque normalmente se considera el cariotipo como una característica distintiva de una especie, lo cierto es que muchas especies son polimórficas para el número y la morfología de sus cromosomas. Los cromosomas extra (supernumerarios), las translocaciones recíprocas y las inversiones segregan en muchas poblaciones de plantas, insectos e incluso mamíferos.

El Cuadro 24-4 muestra la frecuencia de cromosomas supernumerarios y de heterocigotos para translocaciones en una población californiana de la planta *Clarkia elegans*. El cariotipo «típico» de esta especie sería difícil de identificar.

Polimorfismo inmunológico. Ciertos loci de los vertebrados son responsables de la presencia de determinantes antigénicos como los tipos sanguíneos ABO. Se conocen más de 40 determinantes antigénicos de los glóbulos rojos humanos, y varios cientos en el ganado vacuno. Otro polimorfismo humano importante es el sistema HLA de antígenos celulares, implicados en la compatibilidad de trasplantes de tejidos. El Cuadro 24-5 presenta las frecuencias alélicas del locus responsable del sistema de grupos sanguíneos ABO en varias poblaciones humanas muy diferentes. El polimorfismo para el sistema HLA es mucho mayor. Parecen existir dos loci principales, cada uno de ellos con cinco alelos distinguibles. Así, hay $5^2 = 25$ posibles tipos gaméticos diferen-

secuencias de DNA para ir a la caza de otros miembros de la familia de genes homeóticos, basándola en la complementariedad de bases de DNA. Para ello, se realizaron hibridaciones de DNA en condiciones *moderadamente restrictivas*, de modo que pudieran producirse algunos fallos de emparejamiento entre las cadenas que hibridaban sin que se vieran afectados los puentes de hidrógeno correctos formados entre pares de bases vecinos. Algunas de estas búsquedas se realizaron en el propio genoma de *Drosophila*, tratando de encontrar nuevos miembros de la familia. Otras se hicieron en animales distintos, aplicando la técnica de Southern a DNA de distintos animales digerido con enzimas de restricción y empleando como sonda DNA marcado radiactivamente de la secuencia que cifra uno de los homeodominios de *Drosophila*. Con esta estrategia se han podido identificar secuencias de genes homeóticos homólogos en muchos animales diferentes, como humanos y ratones. De hecho, la utilización de un gen conocido para buscar genes relacionados en un organismo de interés suele ser un procedimiento muy provechoso. Algunos de los genes homeóticos de mamíferos son de secuencia extremadamente similar a los de *Drosophila*.

Posiblemente, el caso más sorprendente sea la similitud entre las agrupaciones de genes homeóticos de mamíferos, los denominados complejos Hox, y los complejos ANT-C y BX-C de insectos (complejos de genes homeóticos) (Fig. 23-40). Los complejos ANT-C y BX-C, que están muy separados entre sí en el cromosoma 3 de *Drosophila*, forman un sólo complejo en insectos más primitivos, como el escarabajo de la harina *Tribolium castaneum*. Esto indica que el caso típico en insectos es un único complejo de genes homeóticos, denominado HOM-C. Es más, los genes del complejo HOM-C están dispuestos en el cromosoma en un orden que es colineal con su patrón de expresión espacial: los genes situados a la izquierda del complejo se transcriben cerca del polo anterior del embrión, y cuanto más hacia la derecha en el cromosoma, los genes se transcriben más hacia el polo posterior (compare las partes *a* y *b* de la Fig. 23-40).

No sabemos todavía por qué los genes de los insectos están agrupados u organizados de esa forma colineal con su expresión; pero, con independencia de su posible razón funcional, la misma organización estructural —agrupación y colinealidad con el patrón de expresión— se observa en los genes equivalentes de los mamíferos, organizados en los complejos Hox (Fig. 23-40*a*). La diferencia más notable entre moscas y mamíferos es que, mientras que en el genoma de insectos sólo hay un complejo HOM-C, en los mamíferos hay cuatro complejos Hox situados en cromosomas distintos. Los cuatro complejos Hox son *parálogos*, lo cual significa que la estructura (la ordenación de los genes) de cada complejo es muy similar, como si el complejo entero se hubiera cuadruplicado en el curso de la evolución de los vertebrados. Los genes situados cerca del extremo izquierdo de cada complejo Hox son muy similares, no sólo entre sí, sino también respecto a uno de los genes HOM-C de insectos situados a la izquierda del complejo. Este tipo de relaciones se mantienen a lo largo de los complejos. Por último, y muy notablemente, los genes Hox se expresan de forma segmental durante el desarrollo de los somitos y el sistema nervioso central del ratón (y presumiblemente del embrión humano). Cada gen Hox se expresa en un bloque continuo desde un límite anterior específico, extendiéndose hasta el extremo posterior de la columna vertebral en desarrollo (Fig. 23-41). El límite anterior es diferente para los distintos genes Hox. Dentro de cada complejo Hox, los genes situados más hacia la izquierda tienen el límite más anterior. El límite se va desplazando en dirección al polo posterior conforme el gen correspondiente está situado más hacia la derecha en el complejo Hox. Así pues, los complejos de genes Hox parecen estar dispuestos y expresarse en un orden que resulta ser sorprendentemente similar al de los genes HOM-C de insectos (Fig. 23-40*b*).

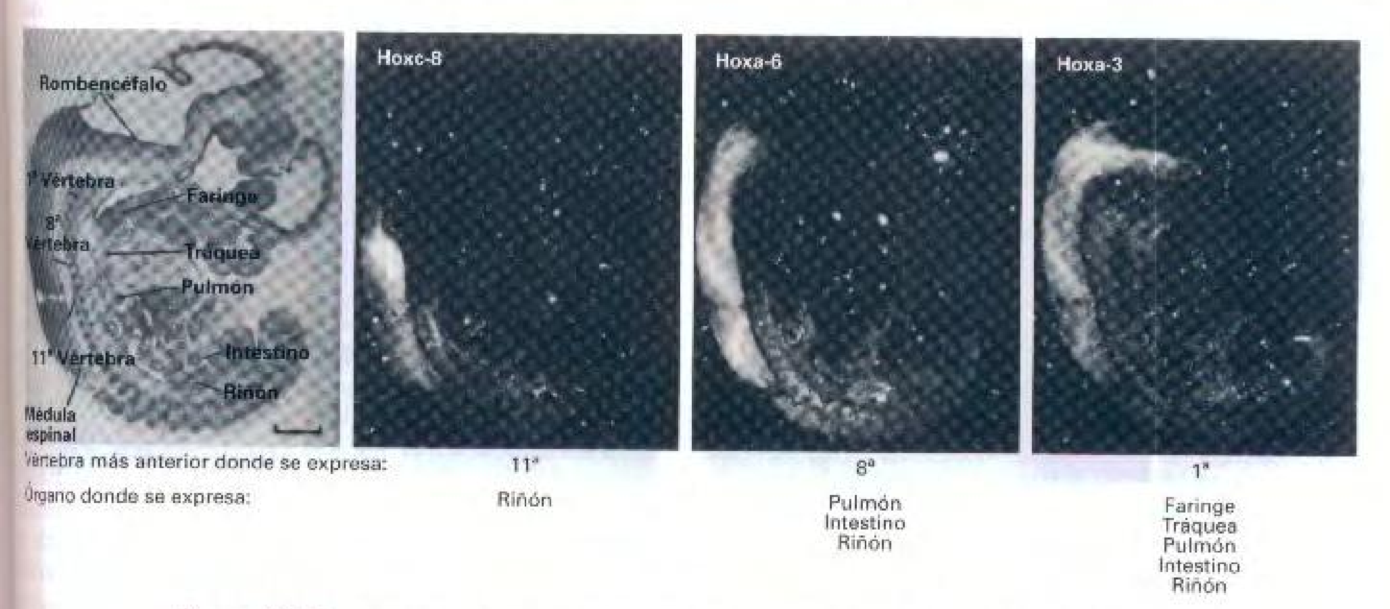


Figura 23-41. Microfotografías que muestran los patrones de expresión de tres genes Hox de ratón en la columna vertebral de un embrión de ratón de 12 días. Puede verse que el límite anterior de cada uno de los patrones de expresión es diferente. (de S. J. Gaunt y P. B. Singh, «Homeogene Expression Patterns and Chromosomal Imprinting,» *Trends in Genetics* 6, 1990, 208.)

La correlación entre estructura y patrón de expresión se ve reforzada por el análisis de los fenotipos mutantes. Las técnicas de mutagénesis *in vitro* permiten obtener de forma eficaz ratones *knockout* con interrupciones en genes concretos. Se han introducido interrupciones en muchos de los genes Hox, y el sorprendente resultado es que los fenotipos de los ratones homocigóticos mutantes son temáticamente paralelos a los fenotipos de las moscas homocigóticas para mutaciones nulas en genes HOM-C. Por ejemplo, la interrupción del gen *Hoxc-8* hace que aparezcan costillas en la primera vértebra lumbar, L1, que es normalmente la primera vértebra sin costillas después de las que sí las tienen (Fig. 23-42). Así pues, la vértebra L1 se ha transformado homeóticamente, adquiriendo la identidad segmental de la vértebra anterior. Para usar la jerga genética, *Hoxc-8*$^-$ ha provocado una modificación del destino de desarrollo hacia una estructura anterior. Parece claro que este gen Hox controla el destino segmental de una manera muy similar a los genes HOM-C, ya que, por ejemplo, la ausencia en *Drosophila* del gen *Ubx* también produce un desplazamiento anterior de destino en el que los segmentos T3 y A1 se transfroman en T2.

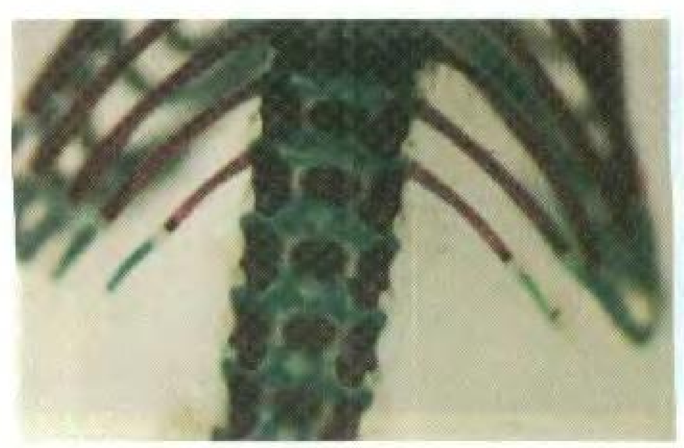
¿Cómo es posible que organismos tan dispares —mosca, ratón, humanos— posean secuencias génicas tan similares? (Lo mismo ocurre con el gusano *C. elegans*) La interpretación más sencilla es que los genes Hox y HOM-C son los descendientes en vertebrados e insectos de un complejo de genes homeóticos presente en un ancestro común que vivió hace unos 600 millones de años. La conservación evolutiva de los genes Hox y HOM-C no es un hecho singular. Se han descubierto muchos ejemplos de conservación evolutiva y funcional de genes y rutas de desarrollo completas. En la Figura 23-43 se presentan rutas conservadas casi por completo que activan los factores de transcripción DL de *Drosophila* y $NF_{\kappa}B$ de mamíferos. Las proteínas de *Drosophila* que actúan en cualquiera de los pasos de la ruta de activación de DL poseen una secuencia de aminoácidos similar a sus correspondientes en la ruta de activación de $NF_{\kappa}B$ en mamíferos. (Independientemente de lo que hace cada proteína, es muy llamativa, simplemente, la increíble conservación de las rutas celulares y de desarrollo, como indican los componentes de las rutas que se representan en los esquemas mediante figuras con la misma forma. Sabemos, en realidad, que DL y $NF_{\kappa}B$ participan en algunas decisiones de desarrollo equivalentes). Ciertamente, como puede comprobarse en la selección de ejemplos conocidos del Cuadro 23-4, tal grado de conservación evolutiva y funcional parece la norma, más que la excepción.

COROLARIO

Los animales utilizan estrategias de desarrollo muy antiguas y altamente conservadas. En esencia, un mamífero, un gusano y una mosca se construyen con los mismos componentes básicos y mecanismos reguladores. *Plus ça change, plus c'est la même chose!* (¡Cuanto más cambia, más resulta ser la misma cosa!).

¿Son comparables los procesos de desarrollo en animales y en plantas?

Los estudios comparativos sobre la formación de patrones en distintos animales, tales como los presentados en las secciones anteriores para mamíferos e insectos, indican que muchas de las rutas de desarrollo fundamentales son muy antiguas y han sido conservadas y mantenidas en muchas, si no todas, las especies animales. La historia natural, la biología celular y el origen evolutivo de las plantas podría, por el contrario, utilizarse como un argumento en contra de la utilización de los mismos conjuntos de rutas para la regulación del desarrollo en las plantas. Éstas tienen sistemas de órganos muy diferentes a los animales, nece-


(a)


(b)

Figura 23-42. Fenotipo de un mutante homeótico de ratón. Se generaron ratones homocigóticos para la inactivación dirigida del gen *Hoxc-8* a partir de células madre embrionarias en cultivo. (a) Las vértebras torácicas y lumbares de un ratón homocigótico *Hoxc-8*$^-$ presentan un mayor tamaño. Pueden verse las costillas producidas por la primera vértebra lumbar, que en los ratones silvestres no aparecen. (b) Los mutantes *Hoxc-8*$^-$ presentan un segundo fenotipo inesperado. Puede verse que el homocigoto mutante, a la derecha, tiene los dedos unidos entre sí, mientras que el silvestre, a la izquierda, tiene dedos normales. (De H. Le Mouellic, Y. Lallemand y P. Brulet, «Homeosis in the Mouse Induced by a Null Mutation in the *Hox-3.1* Gene», *Cell* 69, 1992, 251.)

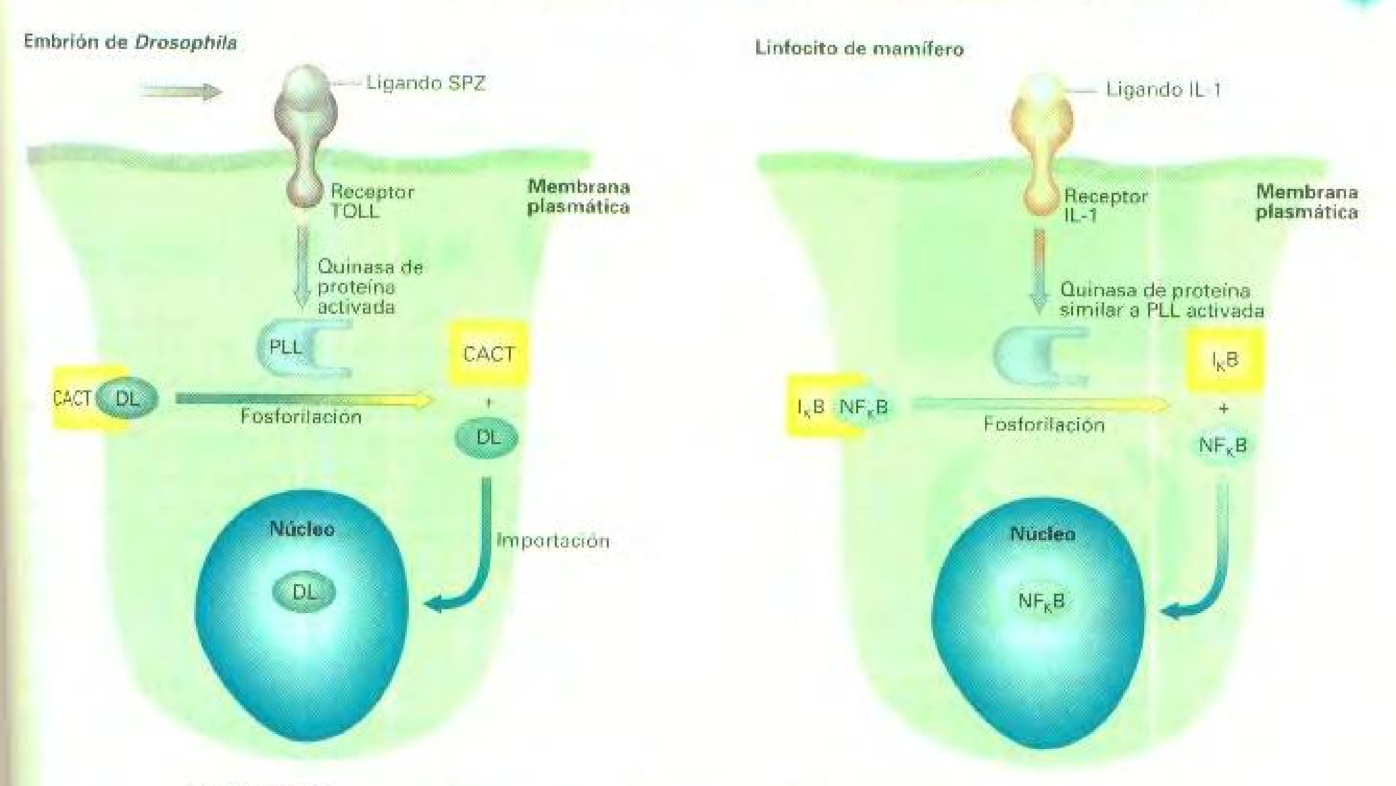
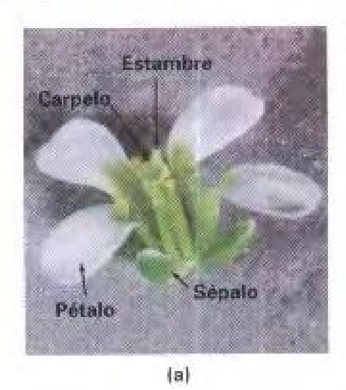


Figura 23-43. La ruta de señalización que activa el morfógeno DL en *Drosophila* es similar a la utilizada en mamíferos para la activación de $NF_κB$, el factor de transcripción que activa la transcripción de los genes que cifran las subunidades de los anticuerpos. Existen similitudes estructurales entre las proteínas SPZ e IL-1, TOLL e IL-1R, CACT e $I_κB$, y DL y $NF_κB$. (Adaptado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell. *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed, Copyright © 1995, Scientific American Books.)

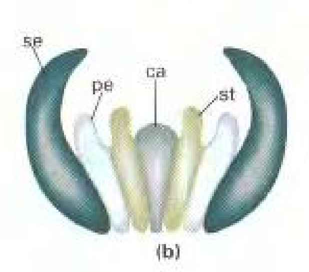
itan paredes celulares rígidas para mantener su estructura, separan la línea germinal de la somática en estadios tardíos del desarrollo, y muestran una gran dependencia de la intensidad de la luz y su duración para inducir diversos procesos del desarrollo. Aun así, las plantas utilizan hormonas para regular la actividad génica, para la comunicación intercelular local mediante señales aún desconocidas y para determinar los diferentes destinos celulares mediante factores de transcripción. Posiblemente, los mecanismos generales que establecen los destinos celulares en los animales son también utilizados por las plantas, aunque es probable que las moléculas que integran estas rutas sean bastante diferentes a las participantes en el desarrollo animal.

Un área especialmente activa en la investigación genética del desarrollo en las plantas utiliza como sistema modelo una pequeña planta con flores llamada *Arabidopsis thaliana*. El genoma de *Arabidopsis* es relativamente pequeño si lo comparamos con el de otras plantas (120 megapares de bases de DNA) y se organiza en un complemento haploide de 5 cromosomas, complejidad y tamaño que puede competir con el del genoma de la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*. Puede cultivarse fácilmente en el laboratorio en tubos de cultivo o placas de Petri, y dado que se autofecunda, los experimentos de mutagénesis pueden realizarse de un modo sencillo. De esta manera, se han aislado numerosas mutaciones con fenotipos interesantes que afectan a diversos aspectos del desarrollo.

Quizás uno de los procesos más intensamente estudiados en *Arabidopsis* sea el desarrollo floral. Del mismo modo que los factores de transcripción HOM/Hox controlan la identidad de los segmentos en el desarrollo animal, un conjunto de reguladores transcripcionales determinan la identidad de las cuatro capas (verticilos) de la flor. Los órganos del verticilo más externo de la flor normalmente adoptan la identidad de sépalos; en el siguiente verticilo, de pétalos; en el siguiente, de estambres, y en el verticilo más interno, se desarrollan los carpelos (Fig. 23-44). Se han identificado varios genes que cuando se inactivan, o bien se expresan ectópicamente, transforman uno o más de los verticilos en otro. Por ejemplo, mutaciones en el gen *AP1* (*Apetala1*) provocan la transformación homeótica de los dos verticilos externos en los dos internos. De modo análogo a los mutantes homeóticos en animales, el número de verticilos no se altera (cuatro), pero la identidad de los órganos se transforma. El estudio de los patrones de expresión espacial y los fenotipos mutantes de los diferentes genes de identidad floral ha dado lugar a un modelo en el cual el destino de cada verticilo se establece mediante la acción combinatorial de múltiples factores de transcripción (Fig. 23-45). Así, los sépalos (el verticilo más externo) se establecen por la expresión de factores de transcripción de clase A exclusivamente. El destino de los pétalos queda determinado por la expresión de factores de transcripción de clase A y de clase B. Los estambres son resultado de la expresión simultánea de factores de transcripción de clase B y de clase C. Finalmente, el destino de los carpelos se establece a través de la expresión de factores de transcripción de únicamente la clase C. Igual que los genes de identidad de los segmentos en animales cifran factores de trans-



(a)



(b)

Figura 23-44. Desarrollo floral en *Arabidopsis thaliana.* (a) Órganos maduros de los cuatro verticilos de la flor. (b) Esquema de una sección longitudinal de la flor en desarrollo, donde se indica el destino normal de los cuatro verticilos. De fuera a dentro son: sépalos (se), pétalos (pe), estambres (st) y carpelos (ca). (Fotografía por cortesía de Vivian F. Irish; de V. F. Irish, «Patterning the Flower» *Developmental Biology* 209, 1999, 211-222.)

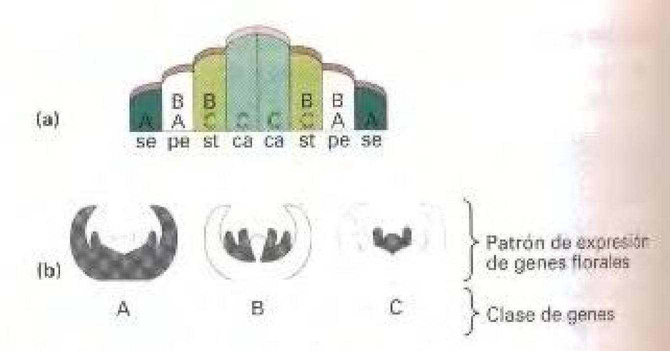


Figura 23-45. Expresión de los genes de identidad de los órganos florales y el establecimiento del destino de los verticilos. (a) Patrones de expresión de los genes correspondientes a cada destino. (b) Las regiones sombreadas de los esquemas de la sección longitudinal de la flor indican los patrones de expresión de los genes de las clases A, B y C. Véase la Figura 23-44 para observar la anatomía normal de la flor en desarrollo. (De V. F. Irish, «Patterning the Flower» *Developmental Biology* 209, 1999, 211-222.)

cripción estructuralemente relacionados (con homeodominios), la mayoría de los genes de identidad floral cifran un conjunto de factores también estructuralmente relacionados (con dominios MADS). Podemos decir que, aunque los detalles sean diferentes, la solución general de utilizar factores de transcripción expresados diferencialmente es uno de los mecanismos por los que se establece el destino celular en las plantas. Con la combinación de métodos genéticos sofisticados y un genoma totalmente secuenciado, los estudios del desarrollo de *Arabidopsis* deberían proporcionarnos un conocimiento mucho más extenso sobre los mecanismos de desarrollo de las plantas.

RESUMEN

Los detalles de cómo tiene lugar el desarrollo animal difieren sin duda de una especie a otra. Sin embargo, los ejemplos que hemos visto aquí ponen de manifiesto los aspectos generales.

En las rutas de desarrollo, la regulación se produce en todos los posibles niveles del proceso de transferencia de información entre el gen y su producto polipeptídico activo.

Al inicio de la vida, cada célula es totipotente: su linaje es potencialmente capaz de diferenciarse en numerosos tipos celulares. Pero, en fases más tardías del desarrollo, el tipo de célula en que puede convertirse se restringe cada vez más. En otras palabras, el destino del linaje se reduce sucesivamente a posibilidades cada vez más limitadas, hasta que queda especificado un destino, y sólo uno.

El primer paso en la generación de patrones es el establecimiento de información posicional. En el embrión temprano, la información posicional define los dos ejes principales: A–P y D–V. El citoesquelto juega un papel clave en el establecimiento de la información posicional y en la asignación de destinos, mediante la localización subcelular de productos génicos concretos. La consecuencia de la información posicional es la creación de un gradiente de actividad de uno o más factores de transcripción. Estos factores inician entonces un proceso jerárquico de toma de decisiones que hace que distintas líneas celulares entren en diferentes rutas de desarrollo, hasta que quedan definidos todos los destinos necesarios. La señalización célula-célula resulta crucial para asegurar que se generan todos los destinos dentro de un campo de desarrollo. Una vez decididos los destinos, bucles de retroalimentación aseguran que esas decisiones se mantengan dentro de un linaje.

Los elementos que componen las rutas de desarrollo son reutilizados una y otra vez en el curso de dicho proceso y están muy conservados dentro del reino animal. Suponemos que esas rutas aparecieron en la evolución hace varios centenares de millones de años en un ancestro común de todos los animales modernos y que, por tanto, gran parte del proceso de desarrollo es temáticamente comparable en todos los animales.

Sin olvidar las importantes diferencias que existen en la biología celular y el desarrollo de plantas y animales, podemos apreciar que hay elementos comunes de regulación génica durante el desarrollo que también se aplican al reino vegetal.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

mutación dirigida de genes / genes homeóticos / totipotencia / microtúbulos / eje A–P / genes gap / genes de polaridad segmental / gradientes de morfógenos / genes parálogos / inhibición lateral / bucles de retroalimentación / información posicional

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

En las rutas de desarrollo, el hecho crucial parece ser la activación de interruptores maestros que ponen en marcha una cascada programada de respuestas reguladoras. Identifique los interruptores maestros y explique cómo operan en los dos casos de determinación y diferenciación del sexo discutidos en este capítulo: **(a)** la determinación del sexo en *Drosophila* y **(b)** la determinación del sexo en los mamíferos.

♦ Solución ♦

a. El interruptor maestro de la determinación del sexo en *Drosophila* es la regulación transcripcional del gen *Sxl* durante la embriogénesis temprana. Las propiedades de la proteína SXL y la existencia de un promotor constitutivo tardío de *Sxl* aseguran que, una vez que se produce proteína SXL activa, un bucle autorregulador mantendrá la formación de proteína SXL activa dentro de la célula. La proteína SXL inicia también una serie de procesamientos regulados de RNA que culminan en la producción de mRNA *dsx-F*. En ausencia de SXL, el modo de procesamiento «por defecto» del RNA generará mRNA *dsx-M*. La clave está, por lo tanto, en si se conecta el interruptor *Sxl* o permanece desconectado. Ello es controlado por el nivel de factores de transcripción del numerador activos. La mayor concentración de estos factores que se produce cuando la razón X:A es 1 resulta necesaria para la activación temprana de la transcripción de *Sxl* y pone en marcha la ruta de desarrollo femenina. Si la concentración de factores de transcripción cifrados en el numerador no es alta, el desarrollo continúa por la ruta por defecto que conduce al desarrollo de un macho.

b. El interruptor maestro de la determinación del sexo en mamíferos es la presencia o ausencia del gen *SRY* ~ *Sry*, que normalmente se encuentra en el cromosoma Y. En presencia del producto proteico de este gen, que actúa como una proteína de unión a DNA, ciertas células de la gónada (las células de Leydig) sintetizan andrógenos, hormonas esteroides inductoras de masculinidad. Estas hormonas se vierten al torrente sanguíneo y actúan sobre tejidos diana para inducir la actividad transcripcional de los receptores de andrógenos. Si no se produce la activación de los receptores de andrógenos, el desarrollo sigue la ruta por defecto que conduce a la generación de una hembra. Los factores que activan la expresión de *SRY* ~ *Sry* en los testículos no se conocen. Como en este caso el interruptor maestro es realmente la presencia o ausencia del propio gen *SRY* ~ *Sry*, es probable que las moléculas que activan a *SRY* ~ *Sry* estén presentes en la gónada indiferenciada desde una fase muy temprana del desarrollo.

PROBLEMAS RESUELTOS

1. Hemos identificado una mutación nueva en *Drosophila*, *mll* (*malelike*) que provoca que las moscas en las que el cociente X:A es 1 se desarrollen fenotípicamente como machos. Queremos comprender cómo actúa el producto del gen *mll* en la ruta de determinación y diferenciación del sexo en *Drosophila*. Para ello, medimos la presencia de las proteínas funcionales SXL, TRA, DSX-F y DSX-M en animales con un cociente X:A de 1. Proponga un papel para la proteína MLL en la ruta indicada para cada uno de los casos siguientes

a. Se detecta la producción de proteína activa SXL temprana, SXL tardía, TRA y DSX-M.

b. Se detecta producción de SXL temprana y DSX-M. No detectamos SXL tardía o TRA.

c. La única proteína funcional que se detecta es DSX-M

♦ Solución ♦

Experimentos como éstos permitieron elucidar la secuencia de la ruta de diferenciación y determinación del sexo en *Drosophila*. En términos más generales, son este tipo de observaciones, en las que se estudia el efecto que tiene una mutación en un gen sobre la expresión del mRNA o la proteína de otro gen, las que nos sirven para ensamblar las piezas que componen las rutas de desarrollo.

a. Dado que las proteínas SXL y TRA están funcionando normalmente en el contexto de un cociente X:A de 1, mientras que el procesamiento alternativo del mRNA *dsx* está produciendo la forma de la proteína específica de macho, probablemente *mll* esté implicado en la regulación del procesamiento del RNA *dsx*.

b. En este caso, el bloqueo parece estar entre la producción de la proteína SXL temprana y la tardía. Esta observación podría

indicar que *mll* juega un papel en la autorregulación del procesamiento alternativo tardío de *Sxl*.

c. En este ejemplo, el bloqueo es anterior a la expresión de *Sxl* en el embrión temprano. Una posible explicación sería que la proteína MLL contribuya a la función del numerador implicada en la interpretación del cociente X:A.

2. En la embriogénesis de los mamíferos, la masa celular interna o ICM (lo que será el futuro feto), se separa rápidamente de las células que formarán las membranas protectoras y los canales respiratorios, nutritivos y excretores entre la madre y el feto

a. Diseñe experimentos, empleando mosaicos de ratones quiméricos, para determinar en qué momento se deciden los dos destinos de desarrollo.

b. ¿Cómo podríamos seguir la formación de las diferentes membranas fetales?

♦ Solución ♦

a. Debemos disponer de marcadores que nos permitan distinguir entre diferentes linajes celulares. Esto puede hacerse en ratones utilizando líneas con diferentes marcadores cromosómicos o bioquímicos. (Otra manera de hacerlo podría ser utilizar diferencias en los cromosomas sexuales de células XX y XY, o inducir pérdidas o aberraciones cromosómicas irradiando los embriones).

Una vez decidido el marcador que vamos a utilizar, una manera de responder a la pregunta es inyectar una única célula de una de las dos líneas en embriones tempranos de la otra en diferentes momentos del desarrollo. Otro procedimiento sería fusionar embriones de las dos líneas con un número concreto de células. En cada caso, deberíamos examinar los embriones una vez que el ICM y las membranas se distinguieran claramente. Cuando la inserción de células o la fusión dé lugar a membranas e ICM exclusivamente compuestas de un tipo celular y no de mosaicos, los dos destinos de desarrollo se han separado.

b. Habría que llevar a cabo los mismos experimentos de inyección de células o de fusión en embriones tempranos y observar los patrones del mosaico resultante. Correlacionando la presencia de células de genotipo similar en las diferentes membranas, debería ser posible determinar los linajes de las células de cada tipo de membranas.

PROBLEMAS

1. Los individuos de *Drosophila* que poseen dos cromosomas X y tres series de autosomas (cociente X:A = 0.67) son intersexuales. Cuando se estudian con más detalle, resulta que ese fenotipo intersexual se debe a la formación de mosaicos. Algunas células se diferencian con un fenotipo enteramente masculino y otras enteramente femenino. Explique esta observación relacionándola con el mecanismo que establece y mantiene el interruptor *Sxl* en conectado-desconectado.

2. En *Drosophila*, los mutantes homocigóticos *tra* desarrollan las moscas XX como machos fenotípicos en cuanto a las características sexuales secundarias. La gónada de *Drosophila* se forma a partir del tejido del mesodermo interno y las células de la línea germinal. Los homocigotos XX ; *tra* son estériles y tienen gónadas rudimentarias. Esto le lleva a sospechar que la razón de la esterilidad es que la mutación *tra* ha transformado el tejido somático en masculino, mientras que las células de la línea germinal siguen manteniendo sus características femeninas. Diseñe un experimento para probar esta hipótesis.

3. Los individuos humanos XYY son machos fértiles, y los XXX, hembras fértiles. ¿Qué podemos concluir de estas observaciones sobre el mecanismo de la determinación del sexo y la compensación de dosis?

4. Ocasionalmente, es posible encontrar personas que son mosaicos de tejido XX y XY. Generalmente, estas personas muestran un fenotipo sexual uniforme. Algunas son fenotípicamente hembras, y otras varones. Explique estas observaciones en relación con el mecanismo de la determinación del sexo en los mamíferos.

5. Existen mutaciones dominantes del gen *Sxl*, denominadas alelos Sxl^M, que provocan que los animales XY se desarrollen como hembras, pero que no afectan a los individuos XX. Pueden inducirse fácilmente reversiones de estos alelos Sxl^M mediante tratamiento con mutágenos. Las reversiones resultantes, llamados alelos Sxl^f, producen individuos XY normales; pero, en homocigosis, provocan que los animales XX se desarrollen fenotípicamente como machos. Elabore una explicación posible para estas observaciones, teniendo en cuenta que, normalmente, *Sxl* no es necesario para el desarrollo de los machos.

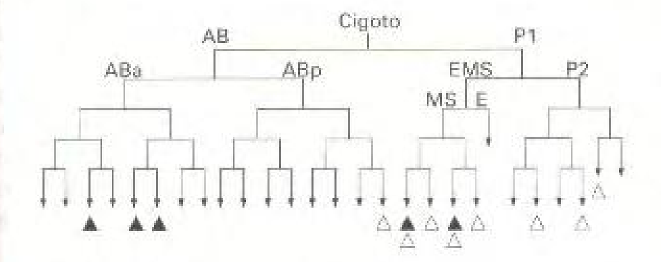
6. Durante el desarrollo de la vulva de *C. elegans*, una célula ancla en la gónada interacciona con seis células del grupo de equivalencia (células con potencial para diferenciarse en partes de la vulva). Las seis células del grupo de equivalencia tienen tres destinos fenotípicos diferentes: primario, secundario y terciario. La célula del gupo de equivalencia más cercana a la célula ancla adopta el fenotipo primario de vulva. Si se elimina la célula ancla por ablación, todas las células del grupo de equivalencia se diferencian como terciarias.

a. Proponga un modelo que explique estos resultados.

b. La célula ancla y las seis células del grupo de equivalencia pueden aislarse y crecerse *in vitro*; diseñe un experimento para probar su modelo.

7. Existen dos tipos de células musculares en *C. elegans*: las del músculo de la faringe y las de los músculos de la pared

corporal, hoy pueden distinguirse entre sí, incluso si son células individuales. En la figura siguiente, las letras designan células precursoras de músculos particulares, los triángulos negros representan músculos de la faringe, y los triángulos blancos, músculos de la pared corporal.



a. Es posible cambiar de sitio estas células durante el desarrollo. Cuando se intercambian las posiciones de ABa y ABp, las células se desarrollan de acuerdo con su nueva posición. En otras palabras, la célula que originalmente estaba en la posición ABa se desarrolla ahora como una célula de músculo de pared corporal, mientras que la que estaba originalmente en la posición ABp da lugar a tres células musculares de faringe. ¿Qué podemos concluir sobre los procesos de desarrollo que controlan los destinos de ABa y ABp?

b. Si EMS se elimina por ablación (aplicando calor con un rayo láser dirigido a través de una lente de microscopio), ningún descendiente de AB se desarrolla como célula muscular. ¿Qué nos sugiere este hecho?

c. Si P_2 se elimina por ablación, todos los descendientes de AB se desarrollan como células musculares. ¿Qué sugiere esta observación?

(Figura adaptada de J. Priess y N. Thompson, *Cell* 48, 1987, 241.)

8. La hormona masculina humana testosterona se une a un receptor específico. Una vez formado, el complejo receptor-hormona activa la transcripción de genes específicamente masculinos. Una mutación en el receptor de testosterona impide la formación del complejo con la hormona. ¿Cual sería el fenotipo de una persona XY homocigótica para dicha mutación? Explique sus conclusiones relacionándolas con el modo de actuación de los receptores de esteroides.

9. Para muchos de los genes Hox de mamíferos, ha podido establecerse una mayor similitud a uno de los genes HOM-C de insectos que a los otros. Describa una estrategia experimental que haga uso de herramientas de Biología molecular y que permita establecer este tipo de relaciones.

10. **a.** Cuando se elimina el 20 % del citoplasma de la región anterior de un embrión de *Drosophila* recién formado, se provoca en fenotipo bicaudal, es decir, la formación de un embrión compuesto por la duplicación especular de los segmentos abdominales. En otras palabras, desde el extremo anterior al posterior del embrión, el orden de los segmentos es A8-A7-A6-A5-A4-A4-A5-A6-A7-A8. Explique este fenotipo relacionándolo con la acción conocida de los determinantes anteriores y posteriores, y de cómo éstos afectan a la expresión de los genes gap.

b. Las hembras homocigóticas para la mutación de efecto materno *nanos* (*nos*) dan lugar a embriones que carecen de segmentos abdominales y presentan segmentos de la cabeza y el tórax más anchos. Relacionándolo con la acción de los determinantes anteriores y posteriores y de los genes gap, explique por qué se produce una pérdida de segmentos en lugar de la duplicación de los segmentos anteriores.

11. Las tres proteínas con homeodominios ABD-B, ABD-A y UBX están cifradas en genes del BX-C de *Drosophila*. En embriones silvestres, el gen *Abd-B* se expresa en los segmentos abdominales posteriores, *abd-A* en los segmentos abdominales intermedios, y *Ubx* en los segmentos abdominales anteriores y en el segmento torácico posterior. Cuando se elimina por deleción el gen *Abd-B*, *abd-A* se expresa tanto en los segmentos abdominales posteriores como en los intermedios. Cuando se elimina *Ubx*, los patrones de expresión de *abd-A* y de *abd-B* no varían de los del silvestre. Cuando se eliminan *abd-A* y *Abd-B*, *Ubx* se expresa en todos los segmentos desde el torácico posterior hasta el extremo posterior del embrión. Explique estas observaciones, teniendo en cuenta el hecho de que los genes gap controlan los patrones de expresión iniciales de los genes homeóticos.

12. En un embrión homocigótico para una mutación en el gen gap *Kr*, las bandas cuarta y quinta (contando desde el extremo anterior) del gen de la regla de los pares *ftz* no se forman normalmente. Explique estos resultados relacionándolos con el modo en que se establece el número de segmentos en el embrión.

13. Cuando estudiamos la formación de los ejes A–P y D–V en *Drosophila*, destacamos que las madres homocigóticas para mutaciones como *bcd*, producían una descendencia uniformemente mutante con defectos en la segmentación. Este resultado siempre se produce, independientemente de si la descendencia es bcd^-/bcd o *bcd/bcd*. Otras mutaciones letales de efecto materno son diferentes por el hecho de que el fenotipo mutante puede ser revertido a silvestre (rescatarse) si el parental masculino aporta un alelo silvestre. En otras palabras, en el caso de estas mutaciones letales de efecto materno rescatables, las moscas mut^-/mut son normales, mientras que las *mut/mut* tienen fenotipo mutante. Proponga una explicación para esta diferencia entre mutaciones letales de efecto materno rescatables y no rescatables.

14. El determinante anterior del embrión de *Drosophila* es *bcd*. Una hembra heterocigótica para una deleción de *bcd* posee una sola copia del alelo bcd^+. Si utilizamos elementos *P* para insertar mediante transformación copias del alelo bcd^+ en el genoma, podemos obtener hembras con un número extra de copias del gen.

Poco después de formarse el blastodermo, el embrión de *Drosophila* desarrolla una hendidura denominada surco cefálico, más o menos perpendicular al eje longitudinal del cuerpo. Entre la descendencia de hembras bcd^+ monosómicas, este surco se encuentra muy próximo al extremo anterior, a $\frac{1}{6}$ de la distancia correspondiente a la longitud total del embrión. En la descendencia de una hembra di-

ploide normal (disómica para *bcd*$^{+}$), la posición del surco cefálico es más posterior, a $\frac{1}{5}$ de la longitud del embrión respecto del extremo anterior. En la de hembras trisómicas *bcd*$^{+}$, su posición es aún más posterior. A medida que se incrementa la dosis génica, se desplaza más y más posteriormente, hasta que en la descendencia de hembras hexasómicas, aparece en la mitad del embrión

a. Explique el efecto de la dosis génica de *bcd*$^{+}$ sobre la formación del surco cefálico, relacionándolo con la contribución de *bcd* al establecimiento del patrón A–P.

b. Haga un esquema de la expresión relativa de los genes gap *Kr* y *kni* en embriones blastodérmicos procedentes de madres monosómicas, disómicas y hexasómicas.

15. En el embrión de *Drosophila*, las regiones 3′ no traducidas (3′ UTR) de los mRNA, es decir, las regiones comprendidas entre el codón de parada y la cola poli(A), son responsables de la localización de *bcd* y *nos* en los polos anterior y posterior, respectivamente. Se han realizado experimentos de intercambio de las 3′ UTR de *bcd* y *nos*. Supongamos que hemos introducido en el genoma de *Drosophila* estas construcciones (mRNA de *nos* con la 3′ UTR de *bcd* y mRNA de *bcd* con la 3′ UTR de *nos*) mediante transformación con elementos *P*. Obtenemos una hembra homocigótica para mutaciones *bcd* y *nos* y portadora de las dos contrucciones con los intercambios. ¿Qué fenotipos esperaríamos en su descendencia respecto del desarrollo del eje A–P?

24

GENÉTICA DE POBLACIONES



Polimorfismo en el color del caparazón de *Liguus fascitus*.
(Tomado de David Hillis, *Journal of Heredity*, July-August 1991.)

Ideas fundamentales

El objetivo de la Genética de poblaciones es comprender la composición genética de las poblaciones y las fuerzas que determinan y cambian dicha composición.

En cualquier especie, gran parte de la variación genética dentro de una población y entre poblaciones aparece por la existencia de varios alelos de diferentes loci.

Una medida fundamental en la Genética de poblaciones es la frecuencia con que aparecen los alelos de un gen dado.

La frecuencia de un alelo concreto en una población puede variar por mutación recurrente, por selección, por migración o por efecto del muestreo aleatorio.

En una población ideal, sobre la que no actúan fuerzas de cambio, las frecuencias genotípicas de un locus concreto permanecerán constantes si los cruzamientos son al azar.

En nuestro recorrido a través de la ciencia de la Genética, hasta ahora sólo hemos tenido en cuenta procesos que ocurren en células y organismos individuales ¿Cómo replica una célula su DNA? ¿Qué origina las mutaciones? ¿De qué manera afectan los mecanismos de segregación y recombinación a los tipos y proporciones de gametos que produce un organismo? ¿Cómo afectan al desarrollo de un organismo las interacciones entre su DNA, la maquinaria celular de síntesis de proteínas, los procesos metabólicos celulares y los efectos ambientales? Pero los organismos no sólo viven como individuos aislados. Interaccionan unos con otros en grupos llamados **poblaciones**, lo que plantea cuestiones acerca de la composición genética de estas poblaciones que no se pueden responder a partir, exclusivamente, del conocimiento que poseemos de los procesos genéticos que se producen en el plano individual. ¿Por qué en los genes de las proteínas Factor VIII y Factor IX, los alelos que causan hemofilia son tan raros en casi todas las poblaciones humanas, mientras que es tan común la anemia falciforme en ciertas zonas de África? ¿Qué modificaciones en la frecuencia de la anemia falciforme se esperarían entre los descendientes de africanos en América del Norte como consecuencia del cambio de condiciones ambientales y de la mezcla entre africanos, europeos y americanos nativos? ¿Qué cambios genéticos tienen lugar en una población de insectos sometida al uso de insecticidas generación tras generación? ¿Qué consecuencias tiene el aumento o el descenso de emparejamientos entre parientes cercanos? Todas son preguntas sobre qué determina la composición genética de las poblaciones y cómo se puede esperar que dicha composición cambie con el tiempo. Estas cuestiones son el terreno de la Genética de poblaciones.

COROLARIO

La Genética de poblaciones relaciona los cambios hereditarios en poblaciones de organismos con los procesos subyacentes individuales de la herencia y el desarrollo.

Para relacionar la composición genética de la población con los procesos básicos en el plano individual, debemos examinar los siguientes factores:

1. El efecto que tiene el *tipo de apareamiento* sobre los diferentes genotipos de la población. Los individuos se pueden aparear al azar, o pueden aparearse preferentemente con parientes cercanos (*endogamia*), o elegir en función de su similitud genotípica o fenotípica (*apareamiento discriminatorio*).

2. Los cambios en la composición de la población debidos a la inmigración de *individuos* procedentes de otras poblaciones.

3. La tasa de introducción de variación genética en la población mediante *mutación* y *recombinación*.

4. El efecto de las diferentes tasas de reproducción de los distintos genotipos, así como las diferentes tasas de supervivencia de sus descendientes, genéticamente distintos. Estas tasas diferentes de reproducción y supervivencia surgen como resultado de la *selección natural*.

5. Debido a que cualquier individuo sólo tiene unos pocos descendientes y el total de la población es limitado, debemos considerar las consecuencias que tienen las *fluctuaciones debidas al azar* sobre las tasas reproductivas de los diferentes genotipos.

La variación y su modulación

La Genética de poblaciones es una ciencia a la vez teórica y experimental. En su faceta experimental, proporciona descripciones de los patrones reales de variación genética que tienen lugar en la población, al tiempo que sirve para calcular los parámetros que definen los procesos de apareamiento, mutación, selección natural y variación al azar en las tasas de reproducción. En su faceta teórica, realiza predicciones sobre la composición genética de una población y sobre cómo cabe esperar que cambie aquélla en respuesta a las diversas fuerzas que operan sobre ella.

COROLARIO

La Genética de poblaciones es el estudio teórico y experimental del modo en que se hereda la variación genética en las poblaciones, y cómo cambia esa variación en el tiempo y en el espacio.

Observaciones de la variación

La Genética de poblaciones se ocupa necesariamente de la variación genotípica pero, por definición, sólo podemos observar la fenotípica. La relación entre fenotipo y genotipo varía en simplicidad de carácter a carácter. En un extremo, el fenotipo puede ser la secuencia conocida de un fragmento del genoma. En este caso, desaparece la diferencia entre genotipo y fenotipo y decimos que, de hecho, estamos observando directamente el genotipo. En el otro extremo se encuentran la mayoría de los caracteres de interés para los criadores de plantas y animales, y para la mayoría de los evolucionistas: las variaciones en el rendimiento, tasa de crecimiento, forma del cuerpo, tasa metabólica y conducta, que constituyen las diferencias más obvias entre variedades y especies. Estos caracteres tienen una relación muy compleja con el genotipo, y debemos utilizar los métodos descritos en el Capítulo 25 para saber algo acerca de sus genotipos. Pero, como veremos en ese capítulo, no siempre es posible emitir afirmaciones muy precisas sobre la variación genotípica que subyace a los caracteres cuantitativos. Por esta razón, la mayoría de los estudios experimentales de Genética de poblaciones se han centrado en caracteres con relaciones sencillas entre genotipo y fenotipo, parecidos a los estudiados en su momento por Mendel. Uno de los temas favoritos de los genetistas de poblaciones humanas es el de los grupos sanguíneos. Los fenotipos cualitativamente distintos de un sistema de grupos sanguíneos, por ejemplo el sistema MN, están determinados por alelos alternativos de un solo locus, y los fenotipos son insensibles a variaciones ambientales.

El estudio de la variación, por tanto, se realiza en dos etapas. La primera es la descripción de la variación fenotípica. La segunda es la traducción de esos fenotipos a términos genéticos y la descripción, esta vez desde el punto de vista genético, de la

CUADRO 24-1. Frecuencias de los genotipos para alelos del locus del sistema de grupos sanguíneos MN en varias poblaciones humanas

	GENOTIPO			FRECUENCIAS ALÉLICAS	
Población	*M/M*	*M/N*	*N/N*	*p(M)*	*q(N)*
Esquimal	0.835	0.156	0.009	0.913	0.087
Aborigen australiana	0.024	0.304	0.672	0.176	0.824
Egipcia	0.278	0.489	0.233	0.523	0.477
Alemana	0.297	0.507	0.196	0.550	0.450
China	0.332	0.486	0.182	0.575	0.425
Nigeriana	0.301	0.495	0.204	0.548	0.452

Fuente: W. C. Boyd, *Genetics and the Races of Man*. D. C. Heath, 1950.

variación. Si hay una perfecta correspondencia de uno a uno entre fenotipo y genotipo, estas dos etapas se convierten en una sola, como es el caso de los grupos sanguíneos del sistema MN. Si la relación es más compleja (como resultado, por ejemplo, de la dominancia, en la que los heterocigotos se parecen a los homocigotos), puede ser necesario llevar a cabo cruzamientos experimentales, o bien observar pedigríes que nos permitan trasladar los fenotipos a genotipos. Éste es el caso del sistema de grupos sanguíneos ABO (véase la pág. 110).

La descripción más sencilla de la variación mendeliana es la distribución de frecuencias de los genotipos de una población. El Cuadro 24-1 muestra la distribución de frecuencias de los tres genotipos del locus de los grupos sanguíneos MN en varias poblaciones humanas. Observe que hay variación entre individuos de una población, ya que aparecen distintos genotipos, y que hay diferencias en las frecuencias de estos genotipos de población a población. Normalmente, en lugar de usar las frecuencias de los genotipos diploides, se utilizan las frecuencias de los distintos alelos del locus. La frecuencia de un alelo es simplemente la proporción de esa forma alélica del gen entre todas las copias del gen en la población. En una población hay el doble de genes que de individuos, porque todos los individuos son diploides, y un homocigoto para un alelo tiene dos copias de ese alelo, mientras que un heterocigoto sólo tiene una copia. Por ello, calculamos la frecuencia de un alelo contando los homocigotos y añadiendo la mitad de los heterocigotos. Así, si la frecuencia de los individuos *A/A* fuera, por ejemplo, 0.36 y la frecuencia de los individuos *A/a* fuera 0.48, la frecuencia del alelo *A* sería 0.36 + 0.48/2 = = 0.60. El Recuadro 24-1 explica la forma general de realizar este cálculo. El Cuadro 24-1 muestra los valores de *p* y *q*, las **frecuencias alélicas** o **frecuencias génicas**, de los grupos sanguíneos MN de varias poblaciones.

Una *medida* de la variación genética (en contraste con su *descripción* por las frecuencias alélicas) es la magnitud de la **heterocigosidad** de un locus en una población, que se refiere a la frecuencia total de individuos heterocigotos para ese locus. Si un alelo tiene una frecuencia muy alta y la del resto es cercana a cero, entonces habrá muy poca heterocigosidad porque, por necesidad, la mayoría de los individuos serán homocigóticos para el alelo más abundante. Se espera que la heterocigosidad sea máxima cuando hay muchos alelos de un locus, todos ellos con la misma frecuencia. En el Cuadro 24-1, la heterocigosidad es simplemente igual a la frecuencia del genotipo *M/N* de cada población. Cuando se considera más de un locus, hay dos modos posibles de calcular la heterocigosidad. En primer lugar, podemos calcular la media de las frecuencias de los heterocigotos en cada locus aislado. Alternativamente, podemos considerar cada haplotipo como una unidad (como en el Cuadro 24-2) y calcular la proporción de todos los individuos portadores de dos formas haplotípicas o gaméticas diferentes. Esta forma de heterocigosidad también se conoce como *diversidad haplotípica* o *diversidad gamética*. El Cuadro 24-2 muestra ambos tipos de cálculo. El locus *S* (el factor de secreción que determina si las proteínas M y N aparecen en la saliva) se encuentra íntimamente ligado al locus *M N*. En el Cuadro aparecen las frecuencias de los cuatro haplotipos (*M S*, *M s*, *N S* y *N s*). Observe que la diversidad haplotípica es siempre mayor que la heterocigosidad media de los loci independientes, porque un individuo es un heterocigoto haplotípico si es heterocigótico para *cualquiera* de sus loci (Véase la discusión sobre el equilibrio de Hardy-Weinberg en el Recuadro 24-2 en la página 722 para saber más sobre el cálculo de la heterocigosidad).

La variación mendeliana simple puede observarse dentro de una población o entre poblaciones de una especie a varios niveles fenotípicos, desde la morfología externa hasta la secuencia de aminoácidos de las enzimas o de otras proteínas. Además, con los nuevos métodos de secuenciación del DNA, se han observado variaciones en la secuencia de nucleótidos (como las variantes en la tercera posición que no suponen variaciones en la

RECUADRO 24-1 Cálculo de las frecuencias alélicas

Si $f_{A/A}$, $f_{A/a}$ y $f_{a/a}$ son las frecuencias de los tres genotipos de un locus con dos alelos, la frecuencia $p(A)$ del alelo A y la frecuencia $q(a)$ del alelo a se obtienen contando los alelos. Como cada homocigoto A/A contiene dos alelos A y sólo la mitad de los alelos de los heterocigotos A/a son del tipo A, la frecuencia total (p) de los alelos A en la población es:

$$p = f_{A/A} + \tfrac{1}{2} f_{A/a} = \text{frecuencia de } A$$

De igual forma, la frecuencia q de los alelos a se dará como:

$$q = f_{a/a} + \tfrac{1}{2} f_{A/a} = \text{frecuencia de } a$$
$$p + q = f_{A/A} + f_{a/a} + f_{A/a} = 1.00$$

De modo que

$$q = 1 - p$$

Si hay múltiples alelos, la frecuencia de cada alelo es simplemente la frecuencia de los homocigotos, más la mitad de la suma de las frecuencias de los heterocigotos en los que aparece el alelo.

CUADRO 24-4. Frecuencias de plantas con cromosomas supernumerarios y de heterocigotos para translocaciones en una población de *Clarkia elegans* en California

Sin supernumerarios ni translocaciones	Supernumerarios
0.560	0.133
Translocaciones	**Tanto translocaciones como supernumerarios**
0.265	0.042

Fuente: H. Lewis, *Evolution* 5, 1951, 142-147.

les, que darían lugar a 25 posibles formas homocigóticas y (25)(24)/2 = 300 heterocigotos diferentes. No todos los genotipos son fenotípicamente distinguibles: sólo se observan 121 clases fenotípicas. L. L. Cavalli-Sforza y W. F. Bodmer han publicado que, en una muestra de tan sólo 100 europeos, se observaron de hecho 53 de los 121 fenotipos posibles.

Polimorfismo proteico. Se han llevado a cabo estudios de polimorfismos genéticos mediante el análisis de los polipéptidos cifrados en los genes estructurales. Si ocurre un cambio no redundante en un codón de la región estructural de un gen (digamos de GGU a GAU), este cambio dará lugar a una sustitución de un aminoácido en el polipéptido producido durante la traducción (en este caso, ácido aspártico por glicina). Si esa proteína pudiera ser purificada de individuos concretos y secuenciada, sería posible detectar en este nivel la variación genética de una población. En la práctica, sin embargo, esta metodología es tediosa para organismos grandes, e imposible para los pequeños, a menos que pudiéramos producir grandes cantidades de proteínas a partir de una línea homocigótica.

Hay, sin embargo, un sustituto práctico de la secuenciación que hace uso de las propiedades físicas de una proteína cuando un aminoácido es sustituido por otro. Cinco aminoácidos (ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina e histidina) tienen cadenas laterales ionizables que confieren a las proteínas una carga neta característica, dependiendo del pH del medio. Las sustituciones de aminoácidos pueden afectar a algunos de estos aminoácidos cargados, o una sustitución no polar cerca de un aminoácido cargado puede afectar a su grado de ionización, o una sustitución en el nexo entre dos hélices α puede producir un cambio leve en la conformación tridimensional del polipéptido plegado. En todos estos casos, la carga neta del polipéptido se verá alterada, porque la carga neta de una proteína no es simplemente la suma de las cargas individuales de sus aminoácidos, sino que depende de la exposición de dichos aminoácidos al medio líquido que las rodea.

Para detectar el cambio en la carga neta, las proteínas se pueden someter al método de la electroforesis en gel. La Figura 24-2 muestra el resultado de la separación de variantes de una enzima esterasa de *Drosophila pseudoobscura*, donde cada calle representa las proteínas de un solo individuo. La Figura 24-3 muestra un gel similar para diferentes variantes de la hemoglobina humana. El Cuadro 24-6 muestra las frecuencias de diferentes alelos de tres loci que determinan enzimas en varias poblaciones de *Drosophila pseudoobscura*: un locus casi monomórfico (deshidrogenasa del málico), un locus moderadamente polimórfico (α-amilasa) y uno muy polimórfico (deshidrogenasa de la xantina).

La técnica de la electroforesis en gel (o la secuenciación) difiere radicalmente de otros métodos de análisis genético en el sentido de que permite el estudio de loci que no están segregando, porque la presencia de un polipéptido es una prueba *prima facie* de la existencia de un gen estructural, es decir, de una secuencia de DNA que determina una proteína. Así, ha sido posible preguntarse qué proporción de todos los genes estructurales del genoma de una especie es polimórfica, y cuál es la heterocigosidad media de una población. Se ha analizado por este método un número muy grande de especies, incluyendo bacterias, hongos, plantas superiores, vertebrados e invertebrados. Los resultados son notablemente consistentes entre las distintas especies. Aproximadamente un tercio de los loci estructurales son polimórficos, y la heterocigosidad media de una población, te-

CUADRO 24-5. Frecuencias de los alelos I^A, I^B e i del locus del sistema de grupos sanguíneos ABO en varias poblaciones humanas

Población	I^A	I^B	i
Esquimal	0.333	0.026	0.641
Sioux	0.035	0.010	0.955
Belga	0.257	0.058	0.684
Japonesa	0.279	0.172	0.549
Pigmea	0.227	0.219	0.554

Fuente: W. C. Boyd, *Genetics and the Races of Man*, D. C. Heath, 1950.

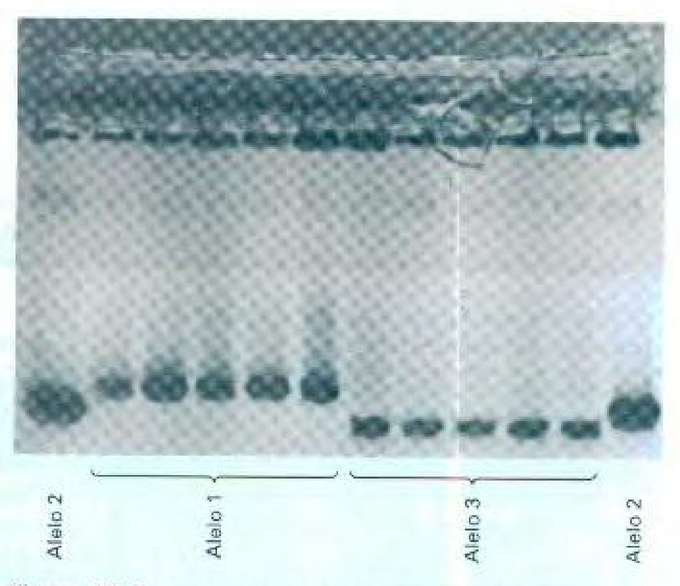


Figura 24-2. Gel de electroforesis en el que se observan homocigotos para tres alelos diferentes del locus *esterasa-5* de *Drosophila pseudoobscura*. Las muestras repetidas del mismo alelo son idénticas, pero hay diferencias reproducibles entre alelos.

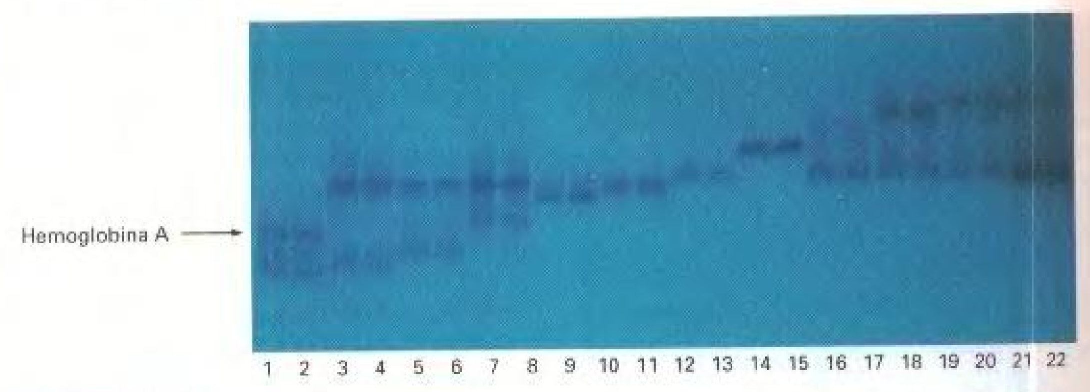


Figura 24-3. Gel de electroforesis en el que se observan muestras procedentes de heterocigotos para la hemoglobina A normal y una serie de variantes del alelo de la hemoglobina. Una de las bandas oscuras está señalada como la hemoglobina A. La segunda banda oscura en cada calle (visible más claramente en las calles 3 y 4) representa la segunda proteína derivada del segundo alelo del heterocigoto. La hemoglobina A no se aprecia en las calles 9 y 10, ya que éstas corresponden a muestras de individuos homocigóticos para el alelo variante (la banda clara cerca de la parte superior del gel, presente en todas las calles, es una proteína distinta de la hemoglobina.)

niendo en cuenta todos los loci estudiados, es de alrededor del 10 %. Esto significa que, rastreando el genoma de un individuo, deberíamos encontrar que cerca de 1 de cada 10 loci está en condición heterocigótica, y que alrededor de 1 de cada 3 loci tiene dos o más alelos segregando en la población. Ello representa un inmenso potencial de variación para la evolución. La desventaja de la técnica electroforética es que detecta la variación sólo en la porción estructural de los genes. Si la mayor parte de la evolución de la forma, fisiología y comportamiento dependiera de cambios en elementos genéticos reguladores, la variación observada en la parte estructural sería irrelevante.

Polimorfismo de secuencias de DNA

El análisis del DNA hace posible examinar variación de secuencias de DNA entre individuos y especies. Estos estudios pueden realizarse a dos niveles. El estudio de la variación en los sitios reconocidos por enzimas de restricción aporta una visión general de los cambios de pares de bases. En un nivel de examen más fino, los métodos de determinación de secuencias de DNA permiten observar la variación nucleótido a nucleótido.

Variación de los sitios de restricción. Una enzima de restricción que reconozca secuencias de seis pares de bases reconocerá su secuencia aproximadamente una vez cada $4^6 = 4096$ pares de bases a lo largo de una molécula de DNA [determinado como la probabilidad de que una base concreta (de las cuales existen cuatro) se encuentre en cada una de las seis posiciones]. Si hay polimorfismo en la población para alguna de las seis bases del sitio de reconocimiento de la enzima se producirá un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*), porque la enzima reconocerá y cortará el DNA en una variante, pero no lo hará en otra variante (véanse las páginas 398-399). Una colección de, por ejemplo, ocho enzimas, permitiría comprobar la existencia de polimorfismos en uno de cada $4096/8 \cong 500$ pares de bases. Sin embargo, cuando se encuentra uno de estos polimorfismos, no sabemos cuál de las seis bases es polimórfica.

CUADRO 24-6. Frecuencias de varios alelos de tres loci que determinan enzimas en cuatro poblaciones de *Drosophila pseudoobscura*

		POBLACIÓN			
Locus (enzima que determina)	Alelo	Berkeley	Mesa Verde	Austin	Bogotá
Deshidrogenasa del málico	*A*	0.969	0.948	0.957	1.00
	B	0.031	0.052	0.043	0.00
α-Amilasa	*A*	0.030	0.000	0.000	0.00
	B	0.290	0.211	0.125	1.00
	C	0.680	0.789	0.875	0.00
Deshidrogenasa de xantina	*A*	0.053	0.016	0.018	0.00
	B	0.074	0.073	0.036	0.00
	C	0.263	0.300	0.232	0.00
	D	0.600	0.581	0.661	1.00
	E	0.010	0.030	0.053	0.00

Fuente: R. C. Lewontin, *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. Columbia University Press, 1974.

Si utilizamos enzimas que reconocen secuencias de cuatro pares de bases, existe un sitio de reconocimiento cada $4^4 = 256$ pares de bases, de modo que una colección de ocho enzimas diferentes permitiría analizar el polimorfismo de uno de cada 32 pares de bases a lo largo del DNA. Además de los cambios de pares de bases que eliminan sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, las inserciones y las deleciones también hacen que los fragmentos de restricción varíen de tamaño.

Se han analizado muestras de diferentes regiones de los genomas de varias especies de *Drosophila*, tanto con enzimas que reconocen dianas de cuatro pares de bases como con enzimas que recorren dianas de seis pares de bases. La Figura 24-4 muestra el resultado de uno de los estudios sobre el gen de la deshidrogenasa de xantina en *Drosophila pseudoobscura*. La figura muestra el patrón de restricción de 53 cromosomas (haplotipos) recogidos en la naturaleza, que son polimórficos para 78 dianas de restricción situados en una secuencia de 4.5 kb. Entre los 53 haplotipos, hay 48 diferentes. (Intente localizar los pares idénticos). No hay duda de que, en la naturaleza, hay una gran variación nucleotídica en el locus de la deshidrogenasa de xantina.

Veinte estudios con enzimas de restricción de diferentes regiones del cromosoma X y de los dos autosomas más grandes de *Drosophila melanogaster* han demostrado que la heterocigosidad por nucleótido es del 0.1-1 %, siendo la media del 0.4 %. Sin embargo, un estudio del cromosoma cuatro, de tamaño muy pequeño, no detectó ningún polimorfismo.

Repeticiones en tándem. Otra forma de variación de secuencia en el DNA que se puede poner de manifiesto empleando enzimas de restricción surge de la existencia de múltiples secuencias repetidas. En el caso humano, existe una gran variedad de secuencias cortas dispersas por todo el genoma, cada una de las cuales se encuentra repetida en múltiples unidades dispuestas en tándem. El número de repeticiones puede variar entre diferentes genomas individuales desde una docena hasta más de 100 unidades. Estas secuencias reciben el nombre de **número variable de repeticiones en tándem** (**VNTR**, del inglés *variable number of tandem repeats*). Si el enzima de restricción corta las secuencias a ambos lados del conjunto de repeticiones, se producirá un fragmento cuyo tamaño será proporcional al número de

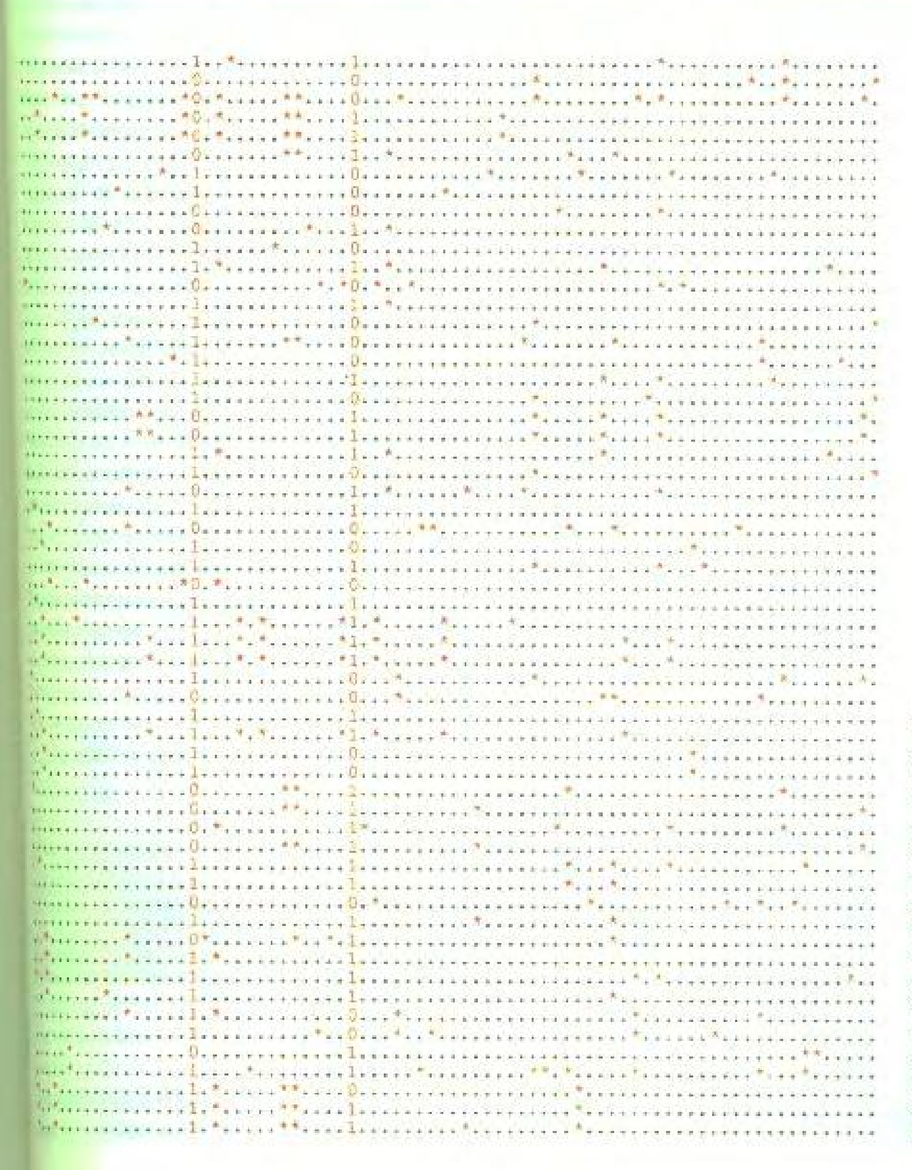


Figura 24-4. Resultado de un análisis del gen de la enzima deshidrogenasa de xantina de *Drosophila pseudoobscura* con una enzima de restricción cuya diana es de cuatro pares de bases, llevado a cabo sobre 53 cromososomas. Cada línea es un cromosoma (haplotipo) tomado de una población natural. Cada posición a lo largo de la línea es una tasa de polimorfismo de restricción a lo largo de las 4.5 kb de secuencia estudiadas. Cuando aparece un asterisco, significa que el haplotipo correspondiente difiere de la mayoría, bien porque se digiere el DNA cuando no corta la enzima en la mayoría de los haplotipos, bien porque no corta cuando sí lo hace en la mayoría. Hay dos posiciones donde no hay un tipo mayoritario claro, por lo que se anota 0 o 1 para mostrar si el lugar de restricción está presente o ausente.

elementos repetidos. Los fragmentos de distinto tamaño migrarán en un gel de electroforesis hasta posiciones diferentes. Por desgracia, los elementos individuales son demasiado cortos para poder distinguirlos entre sí (p. ej., entre elementos de 64 y de 68 pares de bases presentes en las repeticiones), pero se pueden establecer clases o grupos por tamaños, y de esta manera se pueden examinar las poblaciones en función de la frecuencia de las diversas clases de tamaño. El Cuadro 24-7 ofrece los datos de dos tipos de VNTR en un muestreo realizado en dos grupos de indios de Brasil. Respecto a uno de los VNTR, D14S1, los Karitiana son casi enteramente homocigóticos, mientras que los Surui muestran gran variabilidad; en el otro caso, D14S13, ambas poblaciones son variables pero muestran diferentes patrones de frecuencia.

Variación de la secuencia completa. Los estudios de la variación existente en cada par de bases mediante determinación de secuencias de DNA proporcionan información de dos clases. En primer lugar, traduciendo las secuencias de las regiones estructurales obtenidas de diferentes individuos de una población o de individuos de especies diferentes, pueden determinarse las diferencias exactas de aminoácidos. Los estudios electroforéticos sólo demuestran la existencia de variación en las secuencias de aminoácidos, pero no permiten identificar cuántos y qué aminoácidos difieren en los distintos individuos. Así, cuando se obtuvieron las secuencias de nucleótidos del DNA de las variantes electroforéticas de la esterasa-5 de *Drosophila pseudoobscura* (véase la Fig. 24-2), se encontró que las clases electroforéticas diferían entre sí en una media de ocho aminoácidos, y que los veinte diferentes tipos de aminoácidos estaban implicados en los polimorfismos aproximadamente con la misma frecuencia con que estaban representados en la proteína. Tales estudios demuestran también que diferentes regiones de la misma proteína presentan distintos grados de polimorfismo. En el caso de la proteína esterasa-5, compuesta por 545 aminoácidos, el 7 % de las posiciones son polimórficas, pero los últimos aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína son totalmente invariables entre individuos, probablemente debido a restricciones funcionales de esos aminoácidos.

En segundo lugar, la variación al nivel de nucleótidos también puede estudiarse en aquellas bases que no determinan o cambian la secuencia de la proteína. Esto incluye al DNA de los intrones, las secuencias situadas en las regiones 5′ que pueden actuar como elementos reguladores, las secuencias no transcritas en la región 3′ del gen y las posiciones de los codones (normalmente la tercera posición) cuya variación no da lugar a cambios de aminoácidos. Dentro de las regiones estructurales, estos polimorfismos llamados silenciosos o sinónimos son mucho más frecuentes que los cambios que dan lugar a un polimorfismo en la secuencia de aminoácidos, probablemente porque éstos interfieren con el funcionamiento normal de la proteína y son eliminados por selección natural. Un examen del Cuadro del código genético (véase la Fig. 10-27) demuestra que aproximadamente el 25 % de todos los cambios de bases al azar serán sinónimos, dando lugar a un codón alternativo del mismo aminoácido, mientras que el 75 % restante cambiará el aminoácido. Por ejemplo, un cambio de AAT a AAC seguiría determinando el aminoácido asparragina, pero los cambios a ATT, ACT, AAA, AAG, AGT, TAT, CAT o GAT (todos ellos cambios únicos desde AAT) cambiarían el aminoácido en la proteína. Así, si las mutaciones de bases fueran al azar y si la sustitución de un aminoácido por otro no afectara en modo alguno a su función, esperaríamos una proporción 3:1 de sustituciones de aminoácidos frente a polimorfismos silenciosos. Las proporciones reales encontradas en *Drosophila* varían desde 2:1 hasta 1:10. Claramente, hay un gran exceso de polimorfismos sinónimos, lo que demuestra que la mayoría de los cambios de aminoácidos están sujetos a selección natural. No debería suponerse, sin embargo, que los sitios silenciosos de las regiones que determinan proteína están completamente libres de restricciones. Los diferentes tripletes alternativos que determinan el mismo aminoácido pueden diferir en cuanto a fidelidad y velocidad de transcripción, y el mRNA correspondiente a los diferentes tripletes alternativos puede traducirse con diferente velocidad y con distinta fidelidad, debido a las limitaciones de la reserva de tRNA disponibles. Las pruebas de este último efecto son que los tripletes sinónimos y alternativos para un aminoácido no se utilizan de forma igualitaria, y esta desigualdad de uso es mucho más pronunciada en genes que se transcriben con una tasa muy alta.

En las regiones 5′ y 3′ no traducidas y en los intrones hay también limitaciones. Las regiones 5′ y 3′ no traducidas contienen señales importantes para la transcripción, y los intrones pueden contener intensificadores de la transcripción (véase el Cap. 11).

COROLARIO

Existe una gran variación genética en las especies. Ello se manifiesta morfológicamente en la forma y el número de los cromosomas y, molecularmente, en aquellos segmentos de DNA que pueden no tener efectos observables en el desarrollo.

CUADRO 24-7. Frecuencias de los tamaños de dos polimorfismos VNTR diferentes, D14S1 y D14S13, entre las poblaciones Karitiana y Surui de Brasil

	D14S1		D14S13	
Tamaño	Karitiana	Surui	Karitiana	Surui
3-4	105	4	0	0
4-5	0	3	3	14
5-6	0	11	1	4
6-7	0	2	1	2
7-8	0	1	1	2
8-9	3	3	8	16
9-10	0	11	28	9
10-11	0	2	22	0
11-12	0	4	18	8
12-13	0	0	13	18
13-14	0	0	13	3
>14	0	0	0	2
	108	78	108	78

Fuente: Datos de J. Kidd y K. Kidd, *American Journal of Physical Anthropology* 81, 1992, 249.

Variación cuantitativa

La variación de muchos caracteres, como la altura, por ejemplo, no se puede describir en términos de frecuencias alélicas ya que

varían de manera continua dentro de un amplio rango de valores, y no caen dentro de unas pocas categorías fenotípicas. No existe el alelo del fenotipo 180 cm de estatura, ni el que determina 160 cm. Tales caracteres, si su variación se debe a causas genéticas, están influidos por varios genes a la vez, a veces muy numerosos, así como por diversas variables ambientales. Se requieren técnicas especiales para el estudio de estos *caracteres cuantitativos*, técnicas que se describen en el Capítulo 25. De momento, simplemente nos formularemos la pregunta de si las diferencias genéticas entre individuos afectan a la variabilidad observable en una determinada característica fenotípica. Utilizando organismos experimentales, una forma sencilla de responder a esta cuestión es tomar dos grupos de individuos parentales que difieran claramente en el carácter a estudio. A continuación, ambos grupos generan descendencia bajo las mismas condiciones ambientales. Si la descendencia de los dos grupos es diferente, se dice entonces que el carácter es *heredable* (véase el Cap. 25 para una discusión más detallada sobre el concepto y la estimación de la heredabilidad). Una medida simple del grado de heredabilidad responsable de la variación observada es el cociente de la diferencia entre los grupos de descendientes respecto a la diferencia entre los respectivos grupos parentales. Por ejemplo, si dos grupos de parentales de *Drosophila* diferían en, digamos que 0.1 mg de peso, mientras que los grupos de descendientes, surgidos en exactamente las mismas condiciones ambientales, se diferencian en 0.03 mg, la heredabilidad de la diferencia de peso se estimaría en un 30 %. Cuando se aplica esta técnica a la variación morfológica en *Drosophila*, se comprueba que prácticamente cualquier rasgo presenta cierto grado de heredabilidad. Evidentemente, este método no se debe aplicar en situaciones en las que los organismos no están sometidos a un estricto control de las variables ambientales. En nuestra especie, por ejemplo, los hijos de distintos progenitores difieren entre sí no sólo por su constitución genética, sino también debido a que las condiciones ambientales son distintas entre diferentes familias, clases sociales, naciones, etc. Por término medio, los japoneses son más bajos que los europeos, pero estas diferencias de estatura son menores entre los niños norteamericanos de ascendencia japonesa y europea, respectivamente, disminuyendo aún más en la siguiente generación, presumiblemente a causa de la dieta. No parece claro, no obstante, que si los entornos familiares fueran idénticos, pudieran desaparecer todas las diferencias de estatura.

El efecto de la reproducción sexual sobre la variación

Con anterioridad al mendelismo, la herencia mezclada era el modelo dominante. Este modelo postula que las características de cada descendiente son una mezcla intermedia de los caracteres de los progenitores. Este concepto tiene importantes consecuencias para la variación en las poblaciones.

Supongamos que un carácter (por ejemplo, la altura) presenta cierta distribución en la población y que los individuos se emparejan más o menos al azar. De acuerdo con el modelo de la mezcla, si los individuos de fenotipos intermedios se emparejaran entre sí, sólo producirían descendientes de fenotipos intermedios. El emparejamiento de los individuos altos con los bajos también produciría sólo fenotipos intermedios. Nada más que los emparejamientos de individuos altos con altos, y de bajos con bajos, podrían preservar la presencia de los tipos extremos. El resultado neto de todos los emparejamientos sería un incremento de los fenotipos intermedios y un descenso de los fenotipos extremos. La varianza de la distribución disminuiría drásticamente, simplemente como resultado de la reproducción sexual. De hecho, se puede demostrar que el valor de la varianza se reduciría a la mitad en cada generación, de manera que, antes de que hubieran pasado muchas generaciones, la población estaría constituida uniformemente por individuos con fenotipos intermedios.

El redescubrimiento del mendelismo y la naturaleza particulada de la herencia cambió este panorama completamente. Debido a la naturaleza discreta de los genes mendelianos y a la segregación de los alelos en la meiosis, un cruzamiento entre individuos de fenotipos intermedios no produce una descendencia donde todos los individuos tienen fenotipos intermedios. Muy al contrario, se observa la segregación de fenotipos extremos (homocigotos) en la descendencia. Para comprobar las consecuencias de la herencia mendeliana en la variación genética, consideremos una población en la que machos y hembras aparean al azar con relación a un locus génico *A*; es decir, los individuos no eligen a su pareja de forma preferente con respecto al genotipo parcial del locus. Tal apareamiento aleatorio es como si mezcláramos todo el esperma de la población de un lado, todos los óvulos de otro, y eligiéramos aleatoriamente elementos de ambas muestras para realizar las fusiones cigóticas.

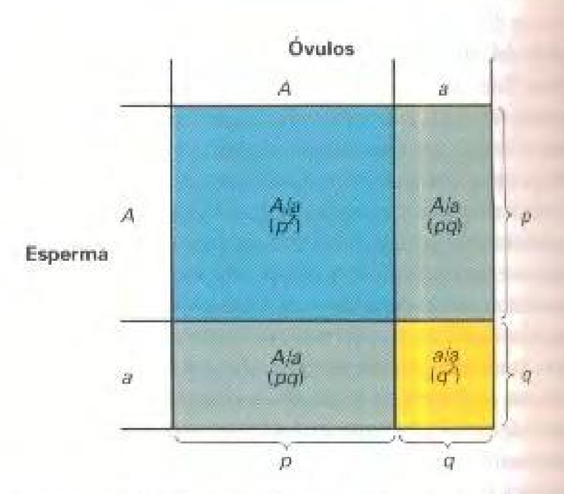
El resultado de este apareamiento al azar de los espermatozoides y los óvulos es fácil de calcular. Si en algunas poblaciones la frecuencia del alelo *A* es de 0.60 en los espermatozoides y en los óvulos, entonces la probabilidad de que tanto el espermatozoide como el óvulo, elegidos aleatoriamente, sean ambos *A* es de $0.60 \times 0.60 = 0.36$. Así, en una población con apareamiento al azar y esta frecuencia alélica, un 36 % de la descendencia será *A/A*. De la misma manera, la frecuencia de los descendientes *a/a* será $0.40 \times 0.40 = 0.16$. Los heterocigotos se producirán mediante la fusión tanto de un espermatozoide *A* y un óvulo *a* como de un óvulo *A* y un espermatozoide *a*. Si los gametos se aparean al azar, la probabilidad de que se fusionen un espermatozoide *A* y un óvulo *a* es 0.60×0.40, y la combinación inversa tiene la misma probabilidad, por lo que la probabilidad de formarse un heterocigoto es $2 \times 0.6 \times 0.4 = 0.48$. Más aún, el proceso de apareamiento al azar no ha tenido ningún efecto sobre las frecuencias de los *alelos*, como se puede comprobar fácilmente mediante el cálculo de las frecuencias con que aparecen los alelos *A* y *a* entre la descendencia (mediante la utilización del método descrito en la pág. 715). Por tanto, las proporciones de homocigotos y de heterocigotos se mantendrán de generación en generación. En el Recuadro 24-2 se ilustra de forma general cómo se mantiene este equilibrio.

COROLARIO

La segregación mendeliana tiene la propiedad de que los cruzamientos al azar conducen a una distribución en equilibrio de los genotipos tras una sola generación, de modo que se mantiene la variación genética.

RECUADRO 24-2 El equilibrio Hardy-Weinberg

Si la frecuencia del alelo *A* es p tanto en los espermatozoides como en los óvulos y la frecuencia del alelo *a* es $q = 1 - p$, la consecuencia de las uniones al azar de los espermatozoides y los óvulos se muestra en la figura adjunta. La probabilidad de que tanto el espermatozoide como el óvulo lleven el alelo *A* es $p \times p = p^2$, de modo que esa será la proporción de homocigotos *A/A* en la siguiente generación. De forma similar, la probabilidad de un heterocigoto *A/a* será $(p \times q) + (q \times p) = 2pq$, y la probabilidad de los homocigotos *a/a* será $q \times q = q^2$. Los tres genotipos, tras una generación de cruzamientos al azar aparecerán con las frecuencias $p^2 : 2pq : q^2$. Como muestra la figura, la frecuencia alélica de *A* no ha cambiado y es todavía p. Por tanto, en la segunda generación, las frecuencias de los tres genotipos serán otra vez $p^2 : 2pq : q^2$, y así para siempre.



Frecuencias del equilibrio Hardy-Weinberg que resultan de los cruzamientos al azar. Las frecuencias de *A* y *a* en los óvulos y en los espermatozoides son p y q $(= 1 - p)$, respectivamente. Las frecuencias totales de los genotipos en los cigotos son p^2 para *A/A*, $2pq$ para *A/a* y q^2 para *a/a*. La frecuencia del alelo *A* en los cigotos es la frecuencia de *A/A* más la mitad de la frecuencia de *A/a*, o $p^2 + pq = p(p + q) = p$.

La distribución en el equilibrio

A/A	*A/a*	*a/a*
p^2	$2pq$	q^2

se conoce como el **equilibrio de Hardy-Weinberg**, por los dos autores que lo descubrieron independientemente (un tercer descubrimiento independiente fue el del genetista ruso Sergei Chetverikov).

El equilibrio Hardy-Weinberg significa que la reproducción sexual no provoca una reducción constante de la variación genética en cada generación; por el contrario, la cantidad de variación permanece constante generación tras generación, en ausencia de otras fuerzas distorsionadoras. El equilibrio es la consecuencia directa de la segregación de los alelos de los heterocigotos durante la meiosis.

Numéricamente, el equilibrio implica que, independientemente de qué genotipos se mezclen en la generación parental, la distribución genotípica tras una ronda de cruzamientos está completamente especificada por la frecuencia alélica p. Por ejemplo, consideremos tres poblaciones hipotéticas:

	f(A/A)	*f(A/a)*	*f(a/a)*
I	0.3	0.0	0.7
II	0.2	0.2	0.6
III	0.1	0.4	0.5

La frecuencia alélica p de *A* en las tres poblaciones es

$$\begin{array}{lll} \text{I} & p = f(A/A) + \frac{1}{2} f(A/a) = & 0.3 + \frac{1}{2}(0) = 0.3 \\ \text{II} & p = & 0.2 + \frac{1}{2}(0.2) = 0.3 \\ \text{III} & p = & 0.1 + \frac{1}{2}(0.4) = 0.3 \end{array}$$

Así, independientemente de las diferentes composiciones genotípicas, las tres poblaciones presentan la misma frecuencia alélica. Sin embargo, tras una generación de cruzamientos al azar, cada una de las tres poblaciones tendrá las mismas frecuencias genotípicas:

A/A	*A/a*	*a/a*
$(0.3)^2 = 0.09$	$2(0.3)(0.7) = 0.42$	$(0.7)^2 = 0.49$

y permanecerán así indefinidamente.

Una consecuencia de las proporciones de Hardy-Weinberg es que los alelos raros no están prácticamente nunca en homocigosis. Un alelo con una frecuencia de 0.001 aparece en homocigosis con una frecuencia de tan sólo uno por millón; la mayor parte de esos alelos raros se encuentran en heterocigosis. En general, puesto que hay dos copias de un alelo en los homocigotos y sólo una en los heterocigotos, la frecuencia relativa del alelo en los heterocigotos (en contraste con los homocigotos) es, según las frecuencias del equilibrio Hardy-Weinberg,

$$\frac{2pq}{2q^2} = \frac{p}{q}$$

que para $q = 0.001$ es una proporción de 999:1. La Figura 24-5 ilustra la relación general entre las frecuencias en homocigotos y heterocigotos en función de las frecuencias alélicas.

En nuestra discusión acerca del equilibrio, supusimos que la frecuencia alélica p es la misma en los espermatozoides que en los óvulos. El teorema del equilibrio de Hardy-Weinberg no es aplicable a los genes ligados al sexo si las hembras y los machos comienzan con distintas frecuencias alélicas.

El equilibrio Hardy-Weinberg se basa en la suposición de que los cruzamientos suceden al azar, pero hemos de distinguir dos posibles situaciones en este proceso. En la primera de ellas, podemos pensar que los individuos no eligen a sus parejas dependiendo de algún carácter heredable. En este sentido, los seres humanos se cruzan al azar respecto a los grupos sanguíneos, por-

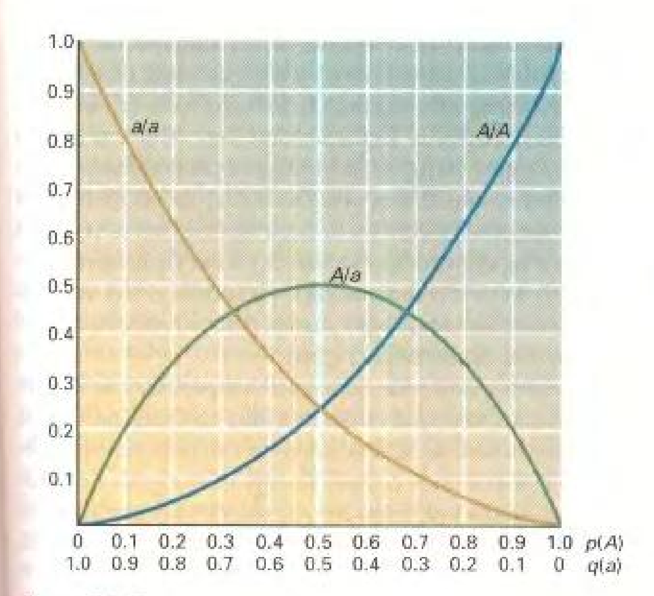


Figura 24-5. Curvas que muestran las proporciones de homocigotos *A/A* (línea azul), homocigotos *a/a* (línea naranja) y heterocigotos *A/a* (línea verde) en poblaciones con diferentes frecuencias alélicas, si las poblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg.

que generalmente no conocen el grupo sanguíneo de sus posibles parejas, y aunque lo supieran no es probable que éste fuera un criterio importante en la elección de la pareja. En este primer sentido, los cruzamientos al azar ocurren con respecto a genes que no afectan a la apariencia externa, la conducta, el olor u otras características que influyen directamente en la elección de la pareja.

Hay un segundo sentido del cruzamiento al azar que es importante cuando hay una subdivisión de una especie en subgrupos. Si existe una diferenciación genética entre subgrupos, de modo que las frecuencias alélicas difieren de grupo a grupo, y si los individuos tienden a emparejarse con miembros de su propio subgrupo (**endogamia**), entonces, con respecto a la especie en su conjunto, los cruzamientos no son al azar y las frecuencias de los genotipos se alejarán en mayor o menor grado de las frecuencias de Hardy-Weinberg. En este sentido, los seres humanos no se cruzan al azar, porque los grupos étnicos y raciales se diferencian unos de otros en las frecuencias alélicas, y las personas muestran mucha endogamia, no sólo entre las razas principales, sino en el seno de grupos étnicos locales. Los españoles y los rusos difieren en sus frecuencias de los grupos sanguíneos ABO. Los españoles se casan con españolas y los rusos se casan con rusas, por lo que hay cruzamientos no aleatorios inintencionados con respecto a los grupos sanguíneos ABO. El Cuadro 24-8 muestra los cruzamientos con respecto al grupo sanguíneo MN, que son al azar para el primero de los sentidos que hemos tenido en cuenta y no lo son para el segundo de los sentidos. Entre las subpoblaciones esquimal, egipcia, china y australiana, los cruzamientos no ocurren en función del grupo MN y, por lo tanto, hay equilibrio Hardy-Weinberg *dentro* de cada subpoblación. Sin embargo, los egipcios no se emparejan con los esquimales o con los aborígenes australianos, de manera que las asociaciones no aleatorias en la especie humana dan lugar *en conjunto* a grandes

CUADRO 24-8. Comparación entre las frecuencias observadas para los genotipos del locus del sistema de grupos sanguíneos MN y las frecuencias esperadas a partir del apareamiento al azar

	OBSERVADAS			ESPERADAS		
Población	*M/M*	*M/N*	*N/N*	*M/M*	*M/N*	*N/N*
Esquimal	0.835	0.156	0.009	0.834	0.159	0.008
Egipcia	0.278	0.489	0.233	0.274	0.499	0.228
China	0.332	0.486	0.182	0.331	0.488	0.181
Aborigen australiana	0.024	0.304	0.672	0.031	0.290	0.679

Nota: las frecuencias esperadas se calcularon de acuerdo con la fórmula del equilibrio Hardy-Weinberg, utilizando los valores de p y q que se obtienen a partir de las frecuencias observadas.

diferencias en las frecuencias fenotípicas de las subpoblaciones y a un alejamiento del equilibrio Hardy-Weinberg.

Las fuentes de la variación

La teoría de la evolución por variación encierra en sí misma una contradicción peculiar. Si la evolución ocurre por la reproducción diferencial de distintas variantes, esperaríamos que la variante con mayor tasa de reproducción llegue finalmente a dominar la población y que todos los demás genotipos desaparezcan. Pero entonces no quedaría variación para una evolución posterior. Por ello, la posibilidad de que la evolución sea duradera depende de manera crítica de que la variación sea renovable.

Para una población concreta, hay tres fuentes de variación: mutación, recombinación e inmigración de alelos. La recombinación, sin embargo, no provoca variación por sí misma, a menos que haya alelos que estén ya segregando en diferentes loci; de otro modo, la recombinación no tiene efecto sobre la variación. De forma similar, la migración no aporta variación si toda la especie es homocigótica para el mismo alelo. En última instancia, la fuente de toda variación debe ser la mutación.

Variación proveniente de la mutación

Las mutaciones son la *fuente* de la variación, pero el *proceso* de la mutación no conduce por sí mismo a la evolución. La tasa de cambio de la frecuencia alélica por mutación es muy lenta, porque las tasas de mutación espontánea son muy bajas (Cuadro 24-9). La tasa de mutación se define como la probabilidad de que una copia de un alelo cambie a otra forma alélica en una generación. Supongamos que una población fuera totalmente homocigótica para A y que las mutaciones hacia a ocurrieran con una tasa de $\frac{1}{100\,000}$. En ese caso, la frecuencia del alelo a en la siguiente generación sería sólo de $1.0 \times \frac{1}{100\,000} = 0.00001$ y la frecuencia del alelo A sería 0.99999. Tras otra generación, la frecuencia de a aumentaría en $0.99999 \times \frac{1}{100\,000} = 0.000009$, de modo que la nueva frecuencia sería 0.000019, mientras que el alelo original habría reducido su frecuencia a 0.999981. Es obvio que la tasa de aumento del nuevo alelo es extremadamente baja y que *se hace más lenta en cada generación*, porque hay menos copias del alelo

CUADRO 24-9. Tasa de mutaciones puntuales en diferentes organismos

Organismo	Gen	Tasa de mutación por generación
Bacteriófago	Rango de hospedador	2.5×10^{-9}
Escherichia coli	Resistencia al fago	2×10^{-8}
Zea mays (maíz)	*R* (factor de color)	2.9×10^{-4}
	Y (semillas amarillas)	2×10^{-6}
Drosophila melanogaster	Letal medio	2.6×10^{-5}

Fuente: T. Dobzhansky, *Genetics and the Origin of Species*, 3.ª ed., rev. Columbia University Press, 1951.

«antiguo» para mutar. En el Recuadro 24-3 se explica una fórmula general para el cambio de las frecuencias alélicas por mutación.

COROLARIO

Las tasas de mutación son tan bajas que la mutación por sí sola no explica la rápida evolución de las poblaciones y las especies.

Si observamos el proceso de la mutación desde el punto de vista del aumento de un alelo nuevo en particular, en lugar de considerarlo como el descenso del alelo «antiguo», el proceso parece incluso más lento. La mayoría de las tasas de mutación que se han determinado suponen la suma de todas las mutaciones de *A* hacia cualquier forma mutante con un efecto que sea detectable. Es muy verosímil que cualquier cambio *específico* de un par de bases ocurra con una frecuencia de, al menos, dos órdenes de magnitud inferior a la suma de todos los cambios. Es por esto que las «reversiones verdaderas», que de manera precisa restituyen un alelo *A* («mutaciones hacia atrás») son improbables, aunque muchas mutaciones puedan producir alelos que *fenotípicamente* son similares al original.

No es posible medir tasas de mutación específicas de loci implicados en caracteres que varían de forma continua, pero puede determinarse la tasa de acumulación de varianza genética. Comenzando con una línea completamente homocigótica de *Drosophila* derivada de una población natural, en cada generación se restaura por mutación espontánea entre $\frac{1}{1000}$ y $\frac{1}{500}$ de la varianza genética en el número de quetas de la población original.

Variación proveniente de la recombinación

La aparición de variación genética por recombinación puede ser un proceso mucho más rápido que su creación por mutación. Cuando se permite que recombinen durante una sola generación dos cromosomas de *Drosophila* con una tasa de supervivencia

RECUADRO 24-3 Efecto de la mutación sobre las frecuencias alélicas

Sea μ la **tasa de mutación** del alelo *A* hacia otro alelo *a* (la probabilidad de que una copia del alelo *A* se convierta en *a* durante la replicación del DNA que precede a la meiosis). Si p_t es la frecuencia del alelo *A* en la generación *t*, si $q_t = 1 - p_t$ es la frecuencia del alelo *a* y si no hay otras causas que cambien las frecuencias alélicas (no hay selección natural, por ejemplo), entonces el cambio de la frecuencia alélica en una generación es

$$\Delta p = p_t - p_{t-1} = \mu p_{t-1}$$

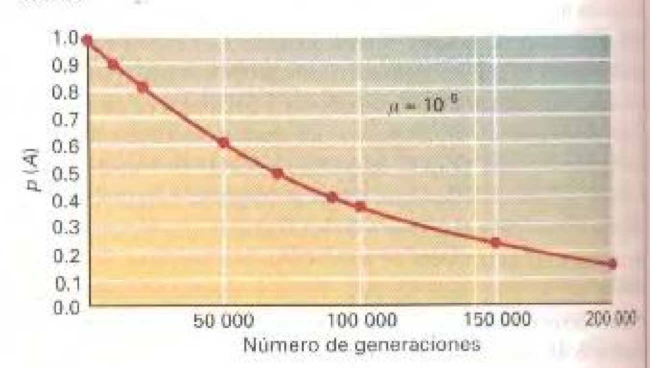
Donde p_{t-1} es la frecuencia en la generación anterior. Esto nos indica que la frecuencia de *A* disminuye (y la frecuencia de *a* aumenta) en una fracción que es proporcional a la tasa de mutación μ y a la proporción p de todos los alelos que están todavía disponibles para mutar. Por tanto, Δp se hace más pequeño a medida que la propia frecuencia de p disminuye, ya que hay cada vez menos alelos *A* para convertirse en alelos *a*. Podemos hacer la aproximación de que, después de n generaciones de mutación,

$$p_n = p_0 e^{-n\mu}$$

donde e es la base de los logaritmos naturales. Esta relación entre la frecuencia alélica y el número de generaciones se muestra en la figura adjunta para $\mu = 10^{-5}$. Después de 10 000 generaciones de mutación recurrente de *A* a *a*,

$$p = p_0 e^{-(10^4) \times (10^{-5})} = p_0 e^{-0.1} = 0.904 p_0$$

Así, si la población comienza sólo con alelos *A* ($p_0 = 1$), todavía habría sólo un 10% de alelos *a* tras 10 000 generaciones, aun con esa tasa de mutación tan alta, y serían necesarias 60 000 generaciones adicionales para reducir p a 0.5. Incluso si la tasa de mutación se duplicara (por ejemplo, por mutágenos ambientales), la tasa de evolución sería muy baja. Por ejemplo, los niveles de radiación de intensidad suficiente para duplicar la tasa de mutación durante el período reproductivo de un organismo humano estarían en el límite de las regulaciones de seguridad, y una dosis de radiación suficiente para aumentar la tasa de mutación en un orden de magnitud sería letal, por lo que no habría un cambio genético como consecuencia de esta alta radiación. Aunque debemos temer a la contaminación por radiación ambiental, no debemos temer convertirnos en una raza monstruosa por su causa.



Cambio de la frecuencia del alelo *A* con las generaciones, debido a la mutación de *A* hacia *a* con una tasa de mutación μ constante de 10^{-5}.

Endogamia y apareamientos discriminatorios

Los cruzamientos al azar respecto a un locus son comunes, pero no universales. Deben distinguirse dos tipos de desviaciones respecto a los cruzamientos al azar. En primer lugar, los individuos pueden cruzarse de forma no aleatoria, por su grado de ascendencia común; es decir, su grado de relación genética. Si los emparejamientos entre parientes ocurren más frecuentemente de lo esperado por puro azar, se dice que la población es **endogámica**. Si son menos corrientes de lo que se espera por azar, se dice que la población está sujeta a **exogamia forzosa** o **endogamia negativa**.

En segundo lugar, los individuos tienden a elegirse entre ellos como pareja, no a causa de su grado de relación genética, sino al grado de parecido entre ellos en algún locus. El sesgo de los apareamientos de semejante con semejante se llama **cruzamiento con discriminación positiva**. El apareamiento con compañeros no semejantes se llama **cruzamiento con discriminación negativa**. La discriminación en los apareamientos nunca es completa.

La endogamia y el apareamiento discriminatorio no son una misma cosa. Los parientes cercanos se parecen entre sí más de lo que se parece la media de los individuos no emparentados, pero no necesariamente para un determinado carácter en un individuo concreto. Por tanto, la endogamia puede producir emparejamientos entre individuos bastante diferentes. Por otro lado, dos individuos pueden parecerse en algún carácter por ser parientes, pero individuos no emparentados también pueden presentar parecidos concretos. No todos los hermanos y hermanas presentan el mismo color de ojos, ni todas las personas de ojos azules están emparentadas.

El apareamiento discriminatorio es corriente para algunos rasgos. En los seres humanos hay una tendencia a la asociación positiva para el color de la piel y la altura, por ejemplo. Una diferencia importante entre el apareamiento discriminatorio y la endogamia es que el primero es específico de un rasgo, mientras que la segunda abarca el genoma completo. Los individuos pueden emparejarse de forma asociativa con respecto a la altura, pero aleatoriamente respecto al grupo sanguíneo. Los primos hermanos, por otro lado, se parecen genéticamente entre sí el mismo grado en todos los loci.

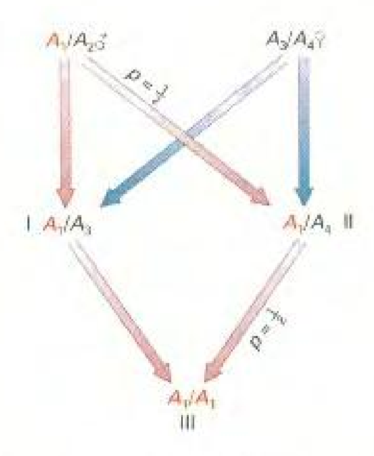


Figura 24-6. Cálculo de la homocigosidad por consanguinidad de un descendiente (III) de una pareja hermano-hermana (I-II). La probabilidad de que II reciba A_1 de su padre es $\frac{1}{2}$; si lo recibe, la probabilidad de que II transmita A_1 al individuo III es $\frac{1}{2}$. Por tanto, la probabilidad de que III reciba el alelo A_1 de II es $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$.

Tanto los cruzamientos con discriminación positiva como la endogamia acarrean la misma consecuencia para la estructura de la población: un aumento en la homocigosidad por encima del nivel predicho por el equilibrio Hardy-Weinberg. Si dos individuos están emparentados, tienen al menos un antecesor común. Hay, por tanto, una probabilidad cierta de que cada uno de los miembros de la pareja sea portador de un alelo que procede de la misma molécula de DNA. El resultado es que hay una probabilidad extra de **homocigosis por consanguinidad**, que debe añadirse a la probabilidad de que la homocigosis ($p^2 + q^2$) derive del apareamiento al azar entre individuos no emparentados. La probabilidad de homocigosis por consanguinidad se denomina **coeficiente de consanguinidad (o de endogamia)** y se representa como F. La Figura 24-6 y el Recuadro 24-5 ilustran cómo se realiza el cálculo de la probabilidad de homocigosis por consanguinidad. Los individuos I y II son totalmente hermanos, porque comparten ambos progenitores (se marcan ambos alelos de los progenitores sólo para rastrearlos). Los individuos I y II se em-

RECUADRO 24-5 Efecto de los cruzamientos entre parientes cercanos sobre el grado de homocigosidad

La probabilidad de obtener un descendiente homocigótico *a/a* de un cruzamiento entre hermano y hermana es:

la probabilidad de que alguno de los dos abuelos sea *A/a*

× la probabilidad de que *a* se transmita al descendiente masculino

× la probabilidad de que *a* se transmita al descendiente femenino

× la probabilidad de que se forme un descendiente homocigótico *a/a* a partir de *A/a* × *A/a*

$= (2pq + 2pq) \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{4}$

$= \dfrac{pq}{4}$

Suponemos que la probabilidad de que ambos abuelos sean *A/a* es despreciable. Si p es muy pequeño, q es casi 1, por lo que la probabilidad de que un descendiente esté afectado está próxima a $p/4$. Para $p = \frac{1}{1000}$, la probabilidad de tener un hijo afectado es de 1 entre 4000, en comparación con la probabilidad de 1 entre un millón para un cruzamiento aleatorio. En general, para hermanos completos, el cociente entre los riesgos será

$$\frac{p/4}{p^2} = \frac{1}{4p}$$

«normal», pertenecientes a individuos procedentes de una población natural, se produce una gama de cromosomas que contienen entre el 25 y el 75 % de la varianza de la supervivencia de la población original silvestre a partir de la cual se muestrearon los cromosomas parentales. Esto es simplemente una consecuencia del gran número de cromosomas recombinantes diferentes que pueden producirse, incluso si sólo consideramos hechos únicos de recombinación. Si un par de cromosomas homólogos es heterocigótico en n loci, tendrá lugar un entrecruzamiento en cualquiera de los intervalos $n - 1$ entre ellos y, como cada hecho de recombinación produce dos cromosomas recombinantes, se generan $2(n - 1)$ tipos gaméticos únicos nuevos en cada generación de entrecruzamiento, incluso considerando un solo hecho de recombinación entre los cromosomas. Si los loci heterocigóticos están muy dispersos en los cromosomas, estos nuevos tipos gaméticos serán frecuentes y se generará una considerable variación. Los organismos asexuales o los que, como las bacterias, experimentan recombinación sexual muy raramente, no tienen esta fuente de variación, por lo que las nuevas mutaciones constituyen el único modo en que pueden aparecer nuevas combinaciones génicas. El resultado es que los organismos asexuales evolucionan más lentamente por selección natural que los organismos sexuales.

Variación proveniente de la migración

Una fuente adicional de variación es la migración hacia una población desde otras poblaciones con frecuencias alélicas distintas. La mezcla de poblaciones resultante tendrá una frecuencia alélica intermedia en algún punto entre su valor original y la frecuencia de la población donante. Supongamos que una población recibe un grupo de inmigrantes igual a, digamos, el 10 % del tamaño de la población nativa. La nueva población tendrá una frecuencia alélica que será una mezcla 0.90:0.10 entre su frecuencia alélica original y la frecuencia alélica de la población inmigrante. Si la frecuencia alélica de A es, por ejemplo, de 0.70, mientras que en la población de origen de los inmigrantes era de 0.40, la nueva población resultante debería tener una frecuencia de $0.70 \times 0.90 + 0.40 \times 0.10 = 0.67$. En el Recuadro 24-4 se muestra este efecto de la migración en términos generales. El cambio en la frecuencia alélica es proporcional a la diferencia entre las frecuencias de la población receptora y la población donante y la proporción de individuos (alelos) provenientes de ésta. A diferencia de la tasa de mutación, la tasa de migración (m) puede ser grande, de modo que el cambio en las frecuencias alélicas puede ser importante.

Debemos entender por *migración* cualquier forma de introducir genes desde una población a otra. Así, por ejemplo, ciertos genes de los europeos han «emigrado» paulatinamente a la población de origen africano de América del Norte, desde que se introdujeron africanos como esclavos. Puede determinarse la magnitud de esa migración midiendo la frecuencia de un alelo que se encuentre sólo en los europeos, y no en los africanos, y compararla con la frecuencia con que aparece hoy día entre los negros norteamericanos.

Podemos emplear la fórmula del cambio en la frecuencia alélica por migración, si la modificamos ligeramente para tener en cuenta el hecho de que han tenido lugar varias generaciones de mezcla. Si la tasa de mezcla no ha sido demasiado grande, entonces (con bastante aproximación) la expresión que relaciona la suma, durante varias generaciones, de las tasas de migración por generación (llamémosla M) con el cambio total en la población receptora tras esas generaciones será la misma que la utilizada para los cambios debidos a la migración. Si llamamos P a la frecuencia alélica de la población donante y p_0 a la frecuencia original entre los receptores, tenemos

$$\Delta p_{\text{total}} = M(P - p_0)$$

de modo que

$$M = \frac{\Delta p_{\text{total}}}{P - p_0}$$

Por ejemplo, el alelo Fy^a del grupo sanguíneo Duffy está ausente en África, pero tiene una frecuencia de 0.42 entre los blancos del estado norteamericano de Georgia. Entre los negros de Georgia, la frecuencia de Fy^a es de 0.046. Por tanto, la migración total de genes de los blancos a la población negra desde la introducción de esclavos en el siglo dieciocho es:

$$M = \frac{\Delta p_{\text{total}}}{P - p} = \frac{0.046 - 0}{0.42 - 0} = 0.1095$$

Cuando el mismo análisis se lleva a cabo con negros norteamericanos de otros lugares como Oakland (California) y Detroit (Michigan), M es 0.22 y 0.26, respectivamente, lo que demuestra que, o bien las tasas de mezcla fueron mayores en esas ciudades, o bien hubo un movimiento diferencial hacia esas ciudades de negros norteamericanos con mayor ascendencia europea. En cualquier caso, la variación genética del locus Fy se ha incrementado por esa mezcla.

RECUADRO 24-4 Efecto de la migración sobre las frecuencias alélicas

Si p_t es la frecuencia de un alelo en la población receptora en la generación t, P es la frecuencia alélica en una población donante (o la media de varias poblaciones donantes) y m es la proporción de la población receptora constituida por los nuevos emigrantes de la población donante, entonces la frecuencia alélica en la población receptora en la siguiente generación, p_{t+1}, es el resultado de mezclar $1 - m$ genes de la población receptora con m genes de la donante. Por tanto,

$$p_{t+1} = (1 - m)p_t + mP = p_t + m(P - p_t)$$

y

$$\Delta p = p_{t+1} - p_t = m(P - p_t)$$

parejan para producir el individuo III. Si el individuo I es A_1/A_2, y el gameto que aporta a III tiene el alelo A_1, podríamos calcular la probabilidad de que el gameto producido por II sea también A_1. Hay una probabilidad $\frac{1}{2}$ de que II reciba un alelo A_1 de su padre, y si lo hace, hay una probabilidad $\frac{1}{2}$ de que transmita el alelo A_1 al gameto en cuestión. Así, la probabilidad de que III reciba un alelo A_1 de II es $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$, y ésta es la probabilidad de que III (fruto del cruzamiento entre individuos completamente hermanos) sea homocigótico por consanguinidad.

Este tipo de endogamia tan fuerte puede acarrear graves consecuencias. Consideremos un alelo deletéreo raro a que, cuando está en homocigosis, provoca una enfermedad metabólica. Si la frecuencia del alelo en la población es p, la probabilidad de que una pareja al azar tenga un descendiente homocigótico es de sólo p^2 (por el equilibrio de Hardy-Weinberg). Si p es, por ejemplo, $\frac{1}{1000}$, la frecuencia de los homocigotos será igual a 1 de 1 000 000. Imaginemos ahora una pareja formada por un hermano y una hermana. Si uno de sus progenitores comunes es heterocigótico para la enfermedad, ambos hermanos pueden recibirlo y ambos pueden transmitirlo a su descendencia. Como muestran los cálculos, cuanto menos frecuente sea el alelo, mayor es el riesgo *relativo* de que un descendiente sea homocigótico por consanguinidad. Para parientes más lejanos, la probabilidad de homocigosis por consanguinidad es menor, pero todavía importante. Para primos hermanos, por ejemplo, el riesgo relativo es $\frac{1}{16}$ de p comparado con un cruzamiento aleatorio.

La endogamia sistemática entre parientes cercanos conduce a la homocigosis completa de la población, pero a diferentes tasas dependiendo del grado de parentesco. Qué alelo se fija en una línea es una cuestión de azar. Si en la población original de la que se obtienen las líneas consanguíneas, el alelo A tiene una frecuencia p y el alelo a tiene una frecuencia $q = 1 - p$, entonces una proporción p de las líneas establecidas por consanguinidad será homocigótica A/A y una proporción q de las líneas será a/a. La endogamia hace uso de la variación genética presente en la población original y la convierte en variación *entre* líneas homocigóticas consanguíneas derivadas de la población original (Fig. 24-7).

Supongamos que se funda una población por un número pequeño de individuos que se cruzan al azar para producir la siguiente generación. Supongamos también que no vuelven a producirse inmigraciones nunca más (por ejemplo, los conejos actuales de Australia probablemente descienden de una introducción única de unos pocos animales en el siglo diecinueve). En las generaciones posteriores, todos los individuos estarán emparentados entre sí porque sus árboles genealógicos tienen antepasados comunes aquí y allá en sus pedigríes. Tal población es, por tanto, endogámica en el sentido de que hay una cierta probabilidad de ser homocigótico para un gen por consanguinidad. Como la población es necesariamente de tamaño finito, algunas de las líneas familiares introducidas originalmente se extinguirán en cada generación, de la misma manera que los apellidos desaparecen en las poblaciones humanas cerradas porque, por azar, no hay descendientes masculinos. Al desaparecer las líneas familiares originales, la población se compone de descendientes de un número cada vez menor de los individuos fundadores originales, y cada vez se hace más probable que todos los miembros de la población lleven los mismos alelos por consanguinidad. En otras palabras, el coeficiente de consanguinidad F aumenta y la heterocigosidad disminuye a lo largo del tiempo hasta que finalmente F alcanza el valor de 1.00, y la heterocigosidad el valor 0.

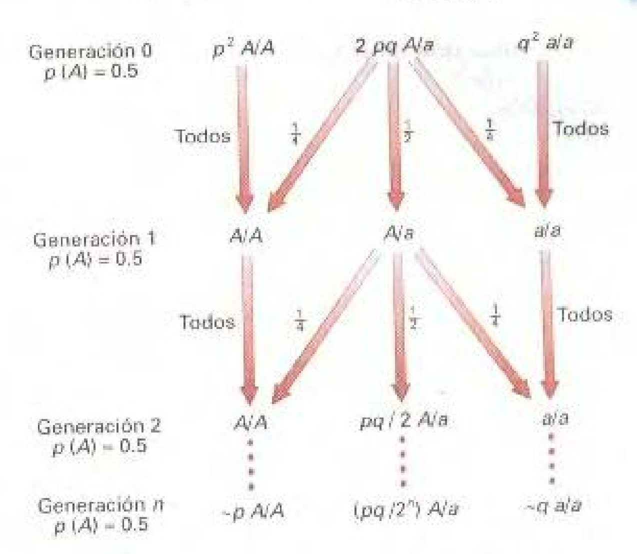


Figura 24-7. Repetidas generaciones de autofecundación (o endogamia) dividirán al final una población heterocigótica en una serie de líneas completamente homocigóticas. La frecuencia de las líneas A/A entre las líneas homocigóticas será igual a la frecuencia del alelo A en la población heterocigótica original.

La tasa de pérdida de heterocigosidad por generación en esta población cerrada, finita y con cruzamientos aleatorios es inversamente proporcional al número de genomas haploides ($2N$), donde N es el número de individuos diploides de la población. En cada generación se pierde $\frac{1}{2N}$ de la heterocigosidad restante, de modo que:

$$H_t = H_0\left(1 - \frac{1}{2N}\right)^t \cong H_0 e^{-t/2N}$$

donde H_t y H_0 son las proporciones de heterocigotos en la generación número t y en la original, respectivamente. Cuando el número t de generaciones se hace muy grande, H_t se aproxima a 0.

Equilibrio entre endogamia y nueva variación

Toda población de cualquier especie es de tamaño finito, de modo que todas las poblaciones se harían al final homocigóticas y se diferenciarían entre ellas como resultado de la endogamia. Entonces cesaría la evolución. En la naturaleza si embargo, siempre se introduce nueva variación, por mutación y por migraciones entre distintas poblaciones. Por consiguiente, la variación real disponible para la selección natural es un equilibrio entre la introducción de nueva variación y su pérdida por endogamia local. La tasa de pérdida de heterocigosidad en una población cerrada es de $\frac{1}{2N}$, por lo que cualquier diferenciación efectiva entre poblaciones se verá anulada si la nueva variación se introduce con esa tasa o con una tasa mayor.

Selección

Hasta ahora, hemos considerado cambios que se producen en las poblaciones debidos a la mutación, la migración, la recombina-

ción y las formas de apareamiento. Pero estos cambios suceden al azar con respecto al modo en que los individuos viven en su medio ambiente. Los cambios de una especie en respuesta a un ambiente cambiante tienen lugar porque los diferentes genotipos producidos por mutación y recombinación tienen diferente capacidad para sobrevivir y reproducirse. La **selección** se refiere a las tasas diferenciales de supervivencia y reproducción, y provoca cambios en las frecuencias de ciertos genotipos en la población. A este proceso de supervivencia y reproducción diferenciales de los distintos tipos de organismos, Darwin le dio el nombre de **selección natural** por analogía con la **selección artificial** llevada a cabo por los criadores de animales y plantas cuando seleccionaban deliberadamente algunos individuos de un tipo preferible a los demás.

La probabilidad relativa de supervivencia y la tasa de reproducción de un fenotipo o genotipo recibe actualmente el nombre de **aptitud darwiniana** (o **eficacia darwiniana** o **eficacia biológica**). Aunque los genetistas a veces hablan, algo vagamente, de la aptitud de un individuo, el concepto de aptitud se aplica realmente a la reproducción y supervivencia medias de los individuos de una clase fenotípica o genotípica. Debido a sucesos fortuitos ocurridos durante la vida de los individuos, es incluso posible que dos organismos con el mismo genotipo y en el mismo ambiente tengan distintas tasas de supervivencia y reproducción. Lo que cuenta es la aptitud de un genotipo considerada como la media de todos sus portadores.

La aptitud es una consecuencia de la relación entre el fenotipo del organismo y el ambiente en el cual vive, de modo que el mismo genotipo tendrá distintas aptitudes en distintos ambientes. Esta diferencia se debe en parte a que la exposición a diferentes ambientes durante el desarrollo da lugar a diferentes fenotipos a partir de los mismos genotipos. Pero, incluso si el fenotipo es el mismo, el éxito del organismo depende de su ambiente. Tener los pies palmeados es bueno para nadar en el agua, pero es una desventaja para caminar sobre la tierra, como revela la observación de la forma de caminar de un pato. Ningún genotipo es incondicionalmente superior en aptitud a todos los demás en todos los ambientes.

Además, el ambiente no es una situación fija que el organismo experimenta pasivamente. El ambiente de un organismo está definido por las actividades del propio organismo. La hierba seca es parte del ambiente de un pinzón, de modo que los pinzones que son más eficaces recogiéndola gastan menos energía en la construcción de sus nidos y consiguen así una mejor eficacia reproductiva. Si bien la hierba seca es parte del ambiente de los pinzones *porque los pinzones la recogen para construir sus nidos*. Las rocas que se encuentran entre la hierba seca no son parte del ambiente del pinzón, aunque las rocas estén allí físicamente. No obstante, las rocas son parte del ambiente de los zorzales, ya que estos pájaros utilizan las rocas para romper los caparazones de los caracoles. Además, el ambiente definido por las actividades vitales de un organismo evoluciona como resultado de dichas actividades. La estructura del suelo, que determina en parte la clase de plantas que crecerán en él, se altera por el crecimiento de esas mismas plantas. El ambiente es al mismo tiempo la causa y la consecuencia de la evolución de los organismos. A medida que las plantas evolucionaron para hacer fotosíntesis, cambiaron la atmósfera de la Tierra. Partiendo de una atmósfera que apenas tenía oxígeno libre y una alta concentración de dióxido de carbono hasta la atmósfera que actualmente conocemos, que contiene un 21 % de oxígeno y apenas un 0,03 % de dióxido de carbono. Las plantas que actualmente están evolucionando deben hacerlo en el ambiente creado por la evolución de sus propios antepasados.

La aptitud darwiniana o reproductiva no debe confundirse con la «aptitud física» en el sentido cotidiano del término, aunque ambas expresiones pueden estar relacionadas. Sin importar cuán saludable, fuerte y mentalmente alerta esté el poseedor de un genotipo, su aptitud será cero si por alguna razón no deja descendencia. Frases como «los menos aptos están desbordando a los más aptos, de modo que la especie se extinguirá» carecen de sentido. La aptitud de un genotipo es consecuencia de todos los efectos fenotípicos de los genes implicados. Así, un alelo que duplique la fecundidad de sus portadores, pero al mismo tiempo reduzca su vida media en un 10 %, será más apto que sus alternativos, a pesar de su propiedad de acortar la vida. Un ejemplo común es el del cuidado parental. Una ave adulta que gasta gran parte de su energía recogiendo comida para sus crías tendrá menos probabilidad de sobrevivir que aquella que guarda toda la comida para sí. Pero una ave completamente egoísta no dejará descendencia, porque sus crías no podrán arreglárselas por sí mismas. Como consecuencia, el cuidado parental es favorecido por la selección natural.

Dos formas de la selección natural

Ya que las diferencias entre los distintos genotipos respecto a la supervivencia y la reproducción dependen del ambiente en el que viven y se desarrollan, y debido a que los organismos pueden modificar su medio ambiente, existen dos formas básicas de selección. En una de estas formas, la aptitud del individuo no depende de la constitución de la población, es decir, de si su genotipo es raro o frecuente, porque la aptitud no está medida por las interacciones con otros individuos, sino que es una propiedad fija del fenotipo del individuo y del entorno físico externo. Por ejemplo, la capacidad relativa para obtener suficiente agua de dos plantas que viven al borde del desierto dependerá de la profundidad a la que puedan crecer sus raíces y de la cantidad de agua que pierdan a través de su superficie foliar. Estas características son consecuencia de sus patrones de desarrollo y no dependen de la composición de la población en la que viven. En tal caso, la aptitud de un genotipo no depende de lo raro o frecuente que sea en la población y se habla de **aptitud independiente de la frecuencia**.

La otra forma de selección ocurre entre individuos que compiten por un recurso limitado, por capturar una presa o evitar ser capturado por un predador. Entonces, la abundancia relativa de dos genotipos distintos afectará a sus aptitudes. Un ejemplo es el *mimetismo Mulleriano* en las mariposas. Algunas especies de mariposas muy coloreadas (como la monarca y la virrey) tienen un sabor muy desagradable para los pájaros, que aprenden, tras unos pocos intentos, a evitar atacar a las mariposas con esos patrones de dibujos brillantes. Si dos especies difieren en su patrón de coloración, la selección tenderá a hacerlas más pareci-

das, porque ambas estarán protegidas y compartirán la carga del período inicial de aprendizaje del pájaro. El patrón menos frecuente estará en desventaja con respecto al más frecuente, porque las aves aprenderán menos a menudo a evitarlas. Dentro de una especie, la selección natural actuará contra los patrones de color más raros por la misma razón. Cuanto más raro sea un patrón de color mayor será la desventaja selectiva, porque es improbable que las aves hayan tenido una experiencia anterior con un patrón de color de baja frecuencia y, por tanto, no lo evitarán. Éste es un caso de **aptitud dependiente de la frecuencia**.

Por motivos de conveniencia matemática, la mayoría de los modelos de selección natural se basan en la aptitud independiente de la frecuencia. Sin embargo, un gran número de procesos selectivos (quizás la mayoría) son dependientes de la frecuencia. La cinética del proceso evolutivo depende de la forma exacta en que se produce esa dependencia de la frecuencia, y sólo por esa razón ya es difícil generalizar. El resultado de la dependencia *positiva* de la frecuencia (como es el caso de los depredadores en competencia, donde la aptitud aumenta al aumentar la frecuencia) es bastante diferente de la negativa (donde la aptitud de un genotipo disminuye al aumentar la frecuencia). Por simplicidad y para ilustrar las características cualitativas fundamentales de la selección, sólo nos ocuparemos en este capítulo de los modelos de selección independiente de la frecuencia, aunque la conveniencia no debe confundirse con la realidad.

Cómo medir diferencias en la aptitud

En su mayor parte, las aptitudes diferenciales de los distintos genotipos pueden medirse más fácilmente cuando los genotipos difieren en muchos loci. En muy pocos casos (excepto en mutantes de laboratorio, variedades vegetales hortícolas y las principales enfermedades metabólicas), el efecto de una sustitución alélica en un solo locus provoca una diferencia tal en el fenotipo como para que se refleje en diferencias cuantificables en la aptitud. La Figura 24-8 muestra la probabilidad de que varios homocigotos del cromosoma dos de *Drosophila pseudoobscura* sobrevivan hasta el estado de mosca adulta (es decir, su **viabilidad**) a tres temperaturas distintas. Como ocurre normalmente, la aptitud (en este caso, un componente de la aptitud total, la viabilidad) es diferente en ambientes distintos. Unos cuantos homocigotos son letales, o casi letales, a las tres temperaturas, mientras que otros muestran una alta viabilidad a las tres temperaturas. Sin embargo, la mayor parte de los genotipos no muestra la misma viabilidad a todas las temperaturas, y no hay ningún genotipo que sea incondicionalmente el más apto a las tres temperaturas. La aptitud de estos homocigotos cromosómicos no se midió en competición con los otros: todos se midieron frente a un control normal, por lo que no sabemos si son dependientes de la frecuencia. El Cuadro 24-10 muestra un ejemplo de cálculo de las aptitudes dependientes de la frecuencia en homocigotos y heterocigotos para inversiones cromosómicas de *Drosophila pseudoobscura*.

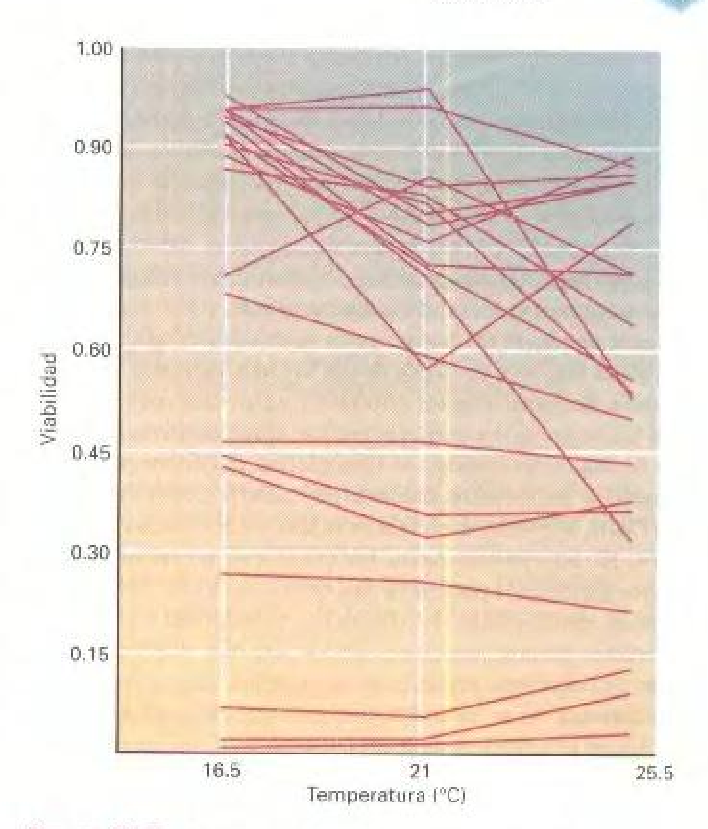


Figura 24-8. Viabilidades de varios homocigotos cromosómicos de *Drosophila pseudoobscura* a tres temperaturas diferentes.

Las «enfermedades metabólicas congénitas» son ejemplos de aptitudes claramente disminuidas relacionadas con sustituciones de alelos en genes concretos. En estas enfermedades, un alelo recesivo interfiere en una ruta metabólica y resulta letal en homocigosis. Un ejemplo en la especie humana es la fenilcetonuria, en la que se produce degeneración de tejidos debido a la acumulación de un intermediario tóxico de la ruta del metabolis-

CUADRO 24-10. Comparación de las aptitudes de los homocigotos y los heterocigotos para inversiones cromosómicas en poblaciones de laboratorio de *Drosophila pseudoobscura*, cuando se miden compitiendo en distintas combinaciones

	HOMOCIGOTOS			HETEROCIGOTOS		
Experimento	ST/ST	AR/AR	CH/CH	ST/AR	ST/CH	AR/CH
Sólo *ST* y *AR*	0.8	0.5	—	1.0	—	—
Sólo *ST* y *CH*	0.8	—	0.4	—	1.0	—
Sólo *AR* y *CH*	—	0.86	0.48	—	—	1.0
ST, *AR* y *CH* juntos	0.83	0.15	0.36	1.0	0.77	0.62

Nota: los tipos cromosómicos son: AR (Arrowhead), CH (Chiricahua) y ST (Standard).

mo de la tirosina. Un caso que ilustra la relación entre la aptitud y el ambiente es la anemia falciforme. Una sustitución alélica en la porción estructural del gen de la cadena β de la hemoglobina da lugar a que, en la posición 6 de la proteína, una valina sustituya al ácido glutámico. La hemoglobina anormal cristaliza a baja presión de oxígeno, deformándose y lisándose los glóbulos rojos. Los homocigotos Hb^S/Hb^S sufren anemia grave y su supervivencia es baja. Los heterocigotos presentan una anemia leve y, bajo circunstancias normales, muestran la misma aptitud, o sólo ligeramente inferior que la de los homocigotos normales Hb^A/Hb^A. Sin embargo, en regiones de África donde hay una incidencia alta de la malaria, los heterocigotos (Hb^A/Hb^S) tienen una *mayor* aptitud que los homocigotos normales porque, aparentemente, la presencia de una cierta cantidad de hemoglobina falciforme protege de la malaria. En los sitios donde no hay malaria, como en América del Norte, se pierde la ventaja en la aptitud de los heterocigotos.

No ha sido posible medir las diferencias en aptitud para la mayor parte de los polimorfismos de un solo locus. Hay algunas pruebas, poco sólidas, de diferencias en la aptitud neta para los diferentes grupos sanguíneos de los sistemas ABO o MN. El gran polimorfismo presente en las especies que se reproducen sexualmente no se ha podido conectar con diferencias cuantificables en la aptitud aunque, en *Drosophila*, sí se han observado en el laboratorio diferencias claras en la aptitud de distintos genotipos correspondientes a unos cuantos loci, como la amilasa α o la deshidrogenasa de alcohol.

Cómo funciona la selección

El modo más simple de ver como actúa la selección es considerar un alelo, *a*, que es completamente letal antes de la edad reproductiva en condición homocigótica, como por ejemplo, el alelo que produce la enfermedad de Tay-Sachs. Supongamos que, en alguna generación, la frecuencia de este alelo es 0.10. Entonces, en una población en la que los cruzamientos se producen al azar, las proporciones de los tres genotipos tras la fecundación serán:

A/A	*A/a*	*a/a*
0.81	0.18	0.01

A la edad reproductiva, sin embargo, los homogigotos *a/a* ya habrán muerto, dejando los genotipos en esta situación:

A/A	*A/a*	*a/a*
0.81	0.18	0.00

Estas proporciones sólo suman 0.99, porque sólo sobrevive el 99 % de la población. Entre los supervivientes que pueden reproducirse, las proporciones deben volver a calcularse dividiendo por 0.99 para que todas las proporciones sumen 1.00. Tras este reajuste tenemos que:

A/A	*A/a*	*a/a*
0.818	0.182	0.00

La frecuencia del alelo letal *a* entre los gametos producidos por esos supervivientes será

$$0.00 + 0.182/2 = 0.091$$

y el cambio de la frecuencia alélica en una generación, expresada como el nuevo valor menos el valor anterior, ha sido $0.091 - 0.100 = -0.019$. Podemos repetir este cálculo para cada generación sucesiva y obtener las frecuencias esperadas de los alelos letales y normales en una serie de generaciones futuras.

Se puede hacer el mismo tipo de cálculo si los genotipos no son simplemente letales y normales, sino que cada genotipo tiene una probabilidad relativa de supervivencia. Este cálculo general se explica en el Recuadro 24-6. Tras una generación de selección, el nuevo valor de la frecuencia de *A* es igual al valor antiguo (p) multiplicado por la relación entre la aptitud media de los alelos *A* y la aptitud de la población completa. Si la aptitud de los alelos *A* es mayor que la aptitud media de todos los alelos, entonces $\overline{W}_A/\overline{W}$ es mayor que 1 y p' es mayor que p. Por tanto, la frecuencia del alelo *A* aumentará en la población. Por el contrario, si $W_A/\overline{W}$ es menor que 1, *A* disminuye. Pero la aptitud media de la población W es la media de las aptitudes de los alelos *A* y *a*. Por ello, si $\overline{W}_A$ es mayor que la aptitud media de la población, debe ser mayor que $\overline{W}_a$, la aptitud media de los alelos *a*.

COROLARIO

La frecuencia del alelo al que corresponde la mayor aptitud media aumentará en la población.

Debe hacerse notar que las aptitudes $W_{A/A}$, $W_{A/a}$ y $W_{a/a}$ pueden expresarse como probabilidades absolutas de tasas de supervivencia y reproducción, o deben ser modificadas con respecto a una escala relativa de aptitudes cuyo máximo es 1.0. Esta nueva escala no tiene absolutamente ningún efecto en la fórmula de p', porque la modificación del numerador se anula con la del denominador.

COROLARIO

El curso de la selección sólo depende de las aptitudes relativas.

Un aumento del alelo que tenga la mayor aptitud implica que aumenta la aptitud media de la población en su conjunto, de modo que la selección también puede describirse como un *aumento en la eficacia biológica media*. Esta regla es estrictamente cierta sólo para aptitudes genotípicas independientes de la frecuencia, pero se aproxima lo bastante a una regla general como para que pueda ser utilizada satisfactoriamente como generalización. Esta propiedad no conduce necesariamente a una situación óptima de la especie en su conjunto, porque las diversas aptitudes sólo se definen en relación con el resto de las aptitudes de la población. Es la aptitud relativa (no la absoluta) la que aumenta con la selección. La población no se hace necesariamente más grande o crece más rápido, ni resulta menos probable que se extinga.

La tasa de cambio de la frecuencia alélica

La expresión general para el cambio en la frecuencia alélica, derivada del Recuadro 24-6, es particularmente clarificadora. Dice que Δp será positivo (*A* aumentará) si la aptitud media de los alelos *A* es mayor que la aptitud media de los alelos *a*, como vimos anteriormente. Pero también muestra que la velocidad del cambio no sólo depende de la diferencia en aptitud entre los alelos, sino también del factor pq, que es proporcional a la fre-

cuencia de los heterocigotos ($2pq$). Para una determinada diferencia de aptitud entre alelos, la frecuencia alélica cambiará más rápidamente cuando los alelos *A* y *a* tengan frecuencias intermedias, de modo que pq será mayor. Si p es cercano a 0 ó 1 (es decir, si *A* o *a* están casi fijados), entonces pq será cercano a 0 y la selección actuará muy lentamente. La Figura 24-9 muestra la curva con forma de «S» que representa el curso de la selección de un nuevo alelo favorable *A* que ha entrado recientemente en una población de homocigotos *a/a*. Al principio, el cambio de la frecuencia es muy pequeño porque p es todavía cercano a 0. El cambio se va acelerando conforme *A* se hace más frecuente, pero se hace otra vez lento a medida que *A* se impone y *a* se hace más raro. Esto es precisamente lo que cabría esperar de un proceso de selección. Cuando la mayor parte de la población es de un tipo, no hay nada que seleccionar. Para que ocurra la evolución por selección natural debe existir variación genética; a mayor variación, más rápido es el proceso.

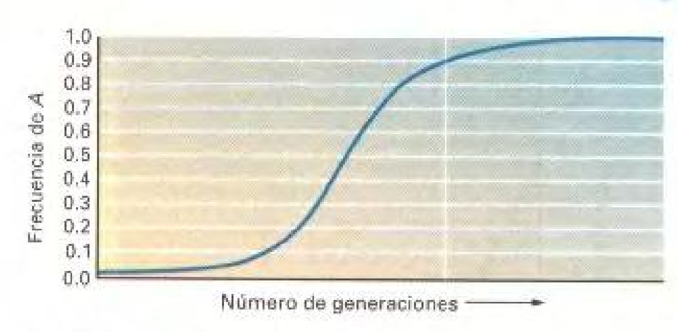


Figura 24-9. Cinética del aumento de la frecuencia de un nuevo alelo favorable *A* que ha entrado en una población de homocigotos *a/a*.

Una consecuencia de la dinámica mostrada en la Figura 24-9 es que resulta muy difícil reducir significativamente la frecuencia de un alelo que ya sea muy raro en la población. Por ello, los programas eugenésicos diseñados para eliminar alelos recesivos deletéreos de las poblaciones humanas, impidiendo la reproducción de las personas afectadas, no funcionan. Por supuesto, si se impidiera la reproducción de todos los heterocigotos, el alelo

RECUADRO 24-6 Efecto de la selección sobre las frecuencias alélicas

Supongamos una población en la que los cruzamientos son al azar con respecto a un locus concreto con dos alelos, y que la población es tan grande que (por el momento) podemos ignorar la endogamia. Inmediatamente después de que los óvulos se hayan fecundado, los cigotos estarán en equlibrio Hardy-Weinberg:

Genotipo	*A/A*	*A/a*	*a/a*
Frecuencia	p^2	$2pq$	q^2

y $p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1.0$, donde p es la frecuencia de *A*.

Supongamos, además, que las probabilidades de sobrevivir hasta la edad adulta (viabilidades) de los tres genotipos son $W_{A/A}:W_{A/a}:W_{a/a}$. Por simplicidad, supongamos también que todas las diferencias selectivas son diferencias en la tasa de supervivencia desde la fecundación del óvulo hasta la edad adulta. Las diferencias en la fertilidad dan lugar a fórmulas matemáticas mucho más complejas. Entonces, las frecuencias entre los descendientes, una vez que hayan alcanzado la etapa adulta, serán:

Genotipo	*A/A*	*A/a*	*a/a*
Frecuencia	$p^2W_{A/A}$	$2pqW_{A/a}$	$q^2W_{a/a}$

Estas frecuencias modificadas no alcanzan a sumar la unidad, porque todas las W son fracciones menores que 1. Sin embargo, podemos hacer un ajuste para que sumen 1, sin que cambie la relación entre ellas, dividiendo cada frecuencia por la suma de las frecuencias tras la selección ($\overline{W}$):

$$\overline{W} = p^2W_{A/A} + 2pqW_{A/a} + q^2W_{a/a}$$

Así definida, llamamos $\overline{W}$ a la **aptitud media** de la población porque es, en realidad, la media de las aptitudes de todos los individuos de la población. Tras este reajuste, tenemos:

Genotipo	*A/A*	*A/a*	*a/a*
Frecuencia	$p^2\dfrac{W_{A/A}}{\overline{W}}$	$2pq\dfrac{W_{A/a}}{\overline{W}}$	$q^2\dfrac{W_{a/a}}{\overline{W}}$

Podemos ahora, sumando los genes, determinar la frecuencia p' del alelo *A* en la siguiente generación:

$$p' = A/A + \tfrac{1}{2}\,A/a = p^2\frac{W_{A/A}}{\overline{W}} + \frac{pqW_{A/a}}{\overline{W}} = p\,\frac{pW_{A/A} + qW_{A/a}}{\overline{W}}$$

Finalmente, tengamos en cuenta que la expresión $pW_{A/A} + qW_{A/a}$ es la aptitud media de los alelos *A* porque, por las frecuencias de Hardy-Weinberg, una proporción p de todos los alelos *A* están presentes en los homocigotos junto a otro *A*, y tienen una aptitud de $W_{A/A}$, mientras que una proporción q de todos los alelos *A* están presentes en los heterocigotos junto a un alelo *a* y tienen una aptitud de $W_{A/a}$. Si representamos $pW_{A/A} + qW_{A/a}$ como $\overline{W}_A$, la nueva frecuencia alélica queda como:

$$p' = p\,\frac{\overline{W}_A}{\overline{W}}$$

Una forma alternativa de observar el proceso de selección es hallar el *cambio* de la frecuencia alélica en una generación:

$$\Delta p = p' - p = \frac{p\overline{W}_A}{\overline{W}} - p = \frac{p(\overline{W}_A - \overline{W})}{\overline{W}}$$

Pero $\overline{W}$, la aptitud media de la población, es la media de las aptitudes alélicas $\overline{W}_A$ y $\overline{W}_a$, de modo que

$$\overline{W} = p\overline{W}_A + q\overline{W}_a$$

Sustituyendo esta expresión de $\overline{W}$ en la fórmula de Δp, y recordando que $q = 1 - p$, obtenemos, (tras algunas manipulaciones algebraicas)

$$\Delta p = \frac{pq(\overline{W}_A - \overline{W}_a)}{\overline{W}}$$

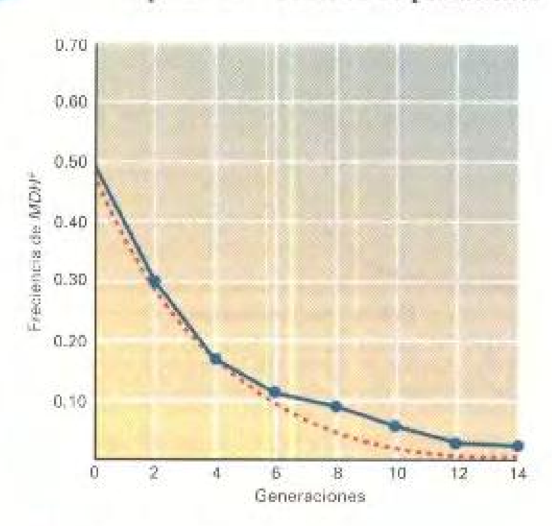


Figura 24-10. Desaparición, por selección, de un alelo del locus de la deshidrogenasa del málico (MDH^F) en una población de laboratorio de *Drosophila melanogaster*. La línea roja discontinua muestra la curva de cambio calculada para unas aptitudes $W_{A/A} = 1.0$, $W_{A/a} = 0.75$, $W_{a/a} = 0.4$ (De R. C. Lewontin, *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. Copyright © 1974 de Columbia University Press. Datos por cortesía de E. Berger.)

desaparecería (excepto por nueva mutación) en una sola generación. Puesto que todos los seres humanos son heterocigóticos para varios alelos deletéreos diferentes, no se permitiría reproducirse a nadie.

Cuando dos alelos alternativos no son raros, la selección puede provocar cambios en las frecuencias alélicas de una forma bastante rápida. La Figura 24-10 muestra el curso de la eliminación de un alelo del gen de la enzima deshidrogenasa del ácido málico en una población de laboratorio de *D. melanogaster*. Las aptitudes en este caso son:

$$W_{A/A} = 1.0 \qquad W_{A/a} = 0.75 \qquad W_{a/a} = 0.40$$

La frecuencia de a no se llega a reducir a 0, y reducciones posteriores de su frecuencia requerirán tiempos más y más largos, como se demuestra en el caso de la eugenesia.

COROLARIO

A menos que los alelos alternativos estén presentes con frecuencias intermedias, la selección (especialmente contra los alelos recesivos) es muy lenta. La selección depende de la variación genética.

Polimorfismo equilibrado

Examinemos de nuevo la fórmula general de los cambios de las frecuencias alélicas (Recuadro 24-6):

$$\Delta p = pq \frac{\overline{W}_A - \overline{W}_a}{\overline{W}}$$

¿En qué condiciones se parará el proceso? ¿Cuándo es $\Delta p = 0$? Dos posibles respuestas son : cuando $p = 0$ o cuando $q = 0$ (es decir, cuando cualquiera de los dos alelos A o a, respectivamente, desaparezca de la población). Una de estas situaciones se dará cuando $\overline{W}_A - \overline{W}_a$ sea consistentemente positivo o negativo, de modo que Δp sea siempre positivo o negativo, independientemente del valor de p. La condición que debe cumplirse para que tal selección unidireccional ocurra es que la aptitud del heterocigoto sea intermedia entre las aptitudes de ambos homocigotos. Si los homocigotos A/A son los más eficaces, los alelos A son más eficaces que los alelos a, tanto en los heterocigotos como en los homocigotos. Entoces, la aptitud media de A, $\overline{W}_A$, será mayor que la aptitud media del alelo a, $\overline{W}_a$, independientemente de cuáles sean las frecuencias de los genotipos. En este caso, $\overline{W}_A - \overline{W}_a$ es positivo, y A siempre aumentará hasta alcanzar un valor de $p = 1$. Si a/a fuera el más apto, $\overline{W}_A - \overline{W}_a$ sería negativo, y a aumentaría hasta alcanzar $q = 1$.

Pero hay otra posibilidad de que $\Delta p = 0$, incluso cuando p y q no son 0:

$$\overline{W}_A = \overline{W}_a$$

lo cual puede ocurrir si el heterocigoto no es intermedio entre los homocigotos, sino que tiene una aptitud más extrema que cualquiera de los dos homocigotos. En este caso, la selección llevará a una frecuencia alélica intermedia, $\hat{p}$ (véase Recuadro 24-7).

Hay, de hecho, dos posibilidades cualitativamente diferentes para $\hat{p}$. Una es que $\hat{p}$ esté en un equilibrio *inestable*. No habrá cambios en la frecuencia si la población tiene exactamente ese valor de p, pero la frecuencia se *alejará* del equilibrio (hacia $p = 0$ ó $p = 1$) si ocurre la más leve perturbación de la frecuencia. Esta situación inestable ocurrirá cuando la aptitud del heterocigoto sea *menor* que la de cualquiera de los homocigotos, situación que es un ejemplo de **infradominancia**. La posibilidad alternativa es un equilibrio *estable*, o **polimorfismo balanceado**, en el cual ligeras perturbaciones del valor de $\hat{p}$ dan como resultado la vuelta al mismo valor $\hat{p}$. La condición para que ocurra este equilibrio es que la aptitud del heterocigoto sea mayor que la de cualquiera de los heterocigotos, condición normalmente denominada **sobredominancia**.

En la naturaleza, la probabilidad de que una frecuencia alélica se encuentre «al filo de la navaja» en un equilibrio inestable es despreciable, por lo que no esperaríamos encontrar polimorfismos naturales en los que los heterocigotos sean menos eficaces que los homocigotos. Por el contrario, el descubrimiento de un polimorfismo duradero en la naturaleza debería ser tomado como prueba de que el heterocigoto es superior.

Desafortunadamente, la vida no se ajusta a la teoría. El locus Rh humano (el grupo sanguíneo Rhesus) presenta un polimorfismo para los alelos Rh^+ y Rh^- muy extendido. Entre los europeos, la frecuencia del alelo Rh^- es aproximadamente de 0.4, mientras que entre los africanos es de alrededor de 0.2. Ello significa que el polimorfismo debe ser muy antiguo, anterior al origen de las modernas razas geográficas. Pero este polimorfismo causa una incompatibilidad entre el feto y la madre cuando una madre RH^- (homocigótica Rh^-/Rh^-) tiene un feto RH^+ (heterocigótico Rh^+/Rh^-). Esta incompatibilidad provoca una anemia hemolítica (por la destrucción de los glóbulos rojos de la sangre) y la muerte del feto en una proporción moderada de los casos en los que la madre ha sido previamente sensibilizada por un embarazo anterior con un feto incompatible. Por tanto, hay una selección contra los heterocigotos, aunque es dependiente de la frecuencia.

RECUADRO 24-7 Selección natural que conduce a un equilibrio de las frecuencias alélicas

En el Recuadro 24-6, la aptitud media de un alelo se definió como la media de las aptitudes de los genotipos que poseen el alelo:

$$\overline{W}_A = (pW_{A/A} + qW_{A/a})$$

y

$$\overline{W}_a = (pW_{A/a} + qW_{a/a})$$

Supongamos que la aptitud de los heterocigotos, $W_{A/a}$, es mayor que cualquiera de las aptitudes de los homocigotos, $W_{A/A}$ y $W_{a/a}$. Entonces, para parte del rango de valores de p, $\overline{W}_A > \overline{W}_a$, mientras que para la parte restante del rango, $\overline{W}_A < \overline{W}_a$. Justo entre estos dos rangos hay un valor de p (representado por $\hat{p}$) para el cual las aptitudes medias de los dos alelos son las mismas. Unas pocas operaciones algebraicas de

$$\overline{W}_A - \overline{W}_a = 0 = (\hat{p}\ W_{A/A} + \hat{q}\ W_{A/a}) - (\hat{p}W_{A/a} + \hat{q}W_{a/a})$$

nos da la solución de p:

$$\hat{p} = \frac{W_{a/a} - W_{A/a}}{(W_{a/a} - W_{A/a}) + (W_{A/A} - W_{A/a})}$$

El valor de equilibrio es un simple cociente entre las diferencias en aptitud de los homocigotos y el heterocigoto. Como ejemplo, supongamos que las aptitudes son:

$W_{A/A}$	$W_{A/a}$	$W_{a/a}$
0.9	1.0	0.8

El equilibrio se alcanzará cuando $\hat{p} = \frac{2}{3}$.

porque sólo ocurre cuando la madre es homocigótica recesiva. Este polimorfismo es inestable y debería haber desaparecido de la especie, pero existe en la mayoría de las poblaciones humanas. Se han propuesto muchas hipótesis para explicar esta aparente estabilidad, pero el misterio permanece.

Por el contrario, no pueden demostrarse diferencias en las aptitudes de los muchos polimorfismos de los diferentes grupos sanguíneos (ni para los extendidos polimorfismos de enzimas detectados por electroforesis). Se ha sugerido que tales polimorfismos no están sujetos en absoluto a selección, sino que

$$W_{A/A} = W_{A/a} = W_{a/a}$$

Esta situación de **neutralidad selectiva** debería satisfacer igualmente el requerimiento de que $\overline{W}_A = \overline{W}_a$; pero, en lugar de un equilibrio estable, da lugar a un **equilibrio pasivo** (o **neutro**) tal que cualquier frecuencia alélica p es tan buena como cualquier otra. Ello deja sin respuesta el problema de cómo las poblaciones se hicieron muy polimórficas al principio. El mejor caso de sobredominancia en la aptitud sigue siendo el de la anemia falciforme, donde los dos homocigotos están en desventaja respecto al heterocigoto por razones muy diferentes.

Los casos mejor estudiados de polimorfismo balanceado, en la naturaleza y en el laboratorio, son los polimorfismos de inversiones cromosómicas en varias especies de *Drosophila*. La Figura 24-11 muestra el curso del cambio de frecuencia de la inversión ST (Standard) en competencia con el tipo cromosómico alternativo CH (Chiricahua) en una población de laboratorio de *D. pseudoobscura*. Las inversiones ST y CH son parte de un polimorfismo cromosómico de poblaciones naturales de esa especie. Las aptitudes estimadas de los tres genotipos de laboratorio son

$$W_{ST/ST} = 0.89 \qquad W_{ST/CH} = 1.0 \qquad W_{CH/CH} = 0.41$$

Aplicando la fórmula del valor $\hat{p}$, en el equilibrio, obtenemos que $\hat{p} = 0.85$, lo que está bastante de acuerdo con las observaciones de la Figura 24-11.

Otra causa de equilibrio genético en las poblaciones se debe al balance existente entre la introducción de nuevos alelos por sucesivas mutaciones recurrentes y su eliminación por selección natural. Este equilibrio es muy probablemente la causa de la existencia de muchos polimorfismos de baja frecuencia en las poblaciones humanas, responsables de enfermedades hereditarias. Continuamente están surgiendo nuevas mutaciones, bien espontáneamente o bien como consecuencia de la acción de mutágenos. Estas mutaciones pueden ser completamente recesivas o parcialmente dominantes. La selección las elimina de la población, pero se alcanza un equilibrio entre su aparición y su eliminación.

La expresión general para esta situación es que la frecuencia del alelo deletéreo en el equilibrio depende del cociente entre la tasa de mutación, μ, y la intensidad de la selección, s, contra el genotipo deletéreo. Para un alelo deletéreo completamente recesivo cuya aptitud en homocigosis sea $1 - s$, la frecuencia en el equilibrio es

$$q = \sqrt{(\mu/s)}$$

Estos resultados se muestran en detalle en el Recuadro 24-8. Así, por ejemplo, un alelo recesivo letal ($s = 1$) que aparece por mutación con una tasa $\mu = 10^{-6}$ presentará una frecuencia en el equili-

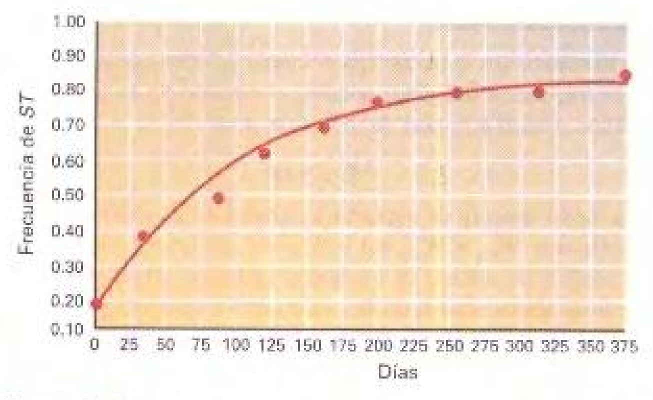


Figura 24-11. Cambios de la frecuencia de la inversión Standard (ST) en competencia con la inversión Chiricahua (CH) en una población de laboratorio de *Drosophila pseudoobscura*. Los puntos muestran las frecuencias reales observadas en sucesivas generaciones. La línea continua representa el curso de cambio teórico esperado si las aptitudes de los genotipos fueran las indicadas en el texto.

brio de 10^{-3}. De hecho, si supiéramos que un alelo es letal recesivo y que no presenta ningún efecto en el heterocigoto, podríamos calcular su tasa de mutación como el cuadrado de la frecuencia alélica. No obstante, la base para tales cálculos debe ser sólida. Anteriormente se creía que la anemia falciforme era debida a un alelo letal recesivo sin efecto en el heterocigoto, lo que condujo a una estimación de la tasa de mutación en África para este locus de 0.1.

Se puede obtener un resultado parecido para un alelo deletéreo con un algún efecto en el heterocigoto. Si asumimos que las aptitudes de los distintos genotipos en un caso de dominancia parcial son $W_{A/A} = 1.0$, $W_{A/a} = 1 - hs$, y $W_{a/a} = 1 - s$, donde h es el grado de dominancia del alelo deletéreo, entonces un cálculo similar nos conduce a

$$\hat{q} = \frac{\mu}{hs}$$

Así, si $\mu = 10^{-6}$ y el alelo letal no es totalmente recesivo sino que tiene un 5 % de efecto deletéreo en el heterocigoto ($s = 1.0$, $h = 0.05$), tenemos

$$\hat{q} = \frac{10^{-6}}{5 \times 10^{-2}} = 2 \times 10^{-5}$$

que es menor en dos órdenes de magnitud que la frecuencia en el equilibrio en el caso de recesividad completa. En general, por consiguiente, podemos esperar que los alelos deletéreos y completamente recesivos tengan frecuencias mucho mayores que las de los alelos parcialmente dominantes.

Selección artificial

En contraste con la dificultad de encontrar en la naturaleza casos simples y de comportamiento sencillo que ejemplifiquen las fórmulas de la selección natural, hay muchos casos registrados de la efectividad de la selección artificial para cambiar fenotípicamente las poblaciones. Estos cambios se han producido en experimentos de selección en el laboratorio, y por selección de plantas y animales en agricultura y ganadería (ejemplo de ello son el aumento de la producción de leche en las vacas y la resistencia a la roya en el trigo). No es posible analizar estos experimentos en términos de frecuencias alélicas, porque no se han identificado y analizado los loci individuales. Sin embargo, está claro que han ocurrido cambios genéticos en las poblaciones y que algunos análisis de poblaciones seleccionadas se han llevado a cabo siguiendo los métodos descritos en el Capítulo 25. La Figura 24-12 muestra, como ejemplo, los grandes cambios conseguidos en el número medio de quetas en un experimento de selección en *D. melanogaster*. La Figura 24-13 muestra los cambios en el número de huevos puestos por gallinas como consecuencia de 30 años de selección.

El método normal de selección es la **selección por truncamiento**. Se mezclan individuos de una determinada generación

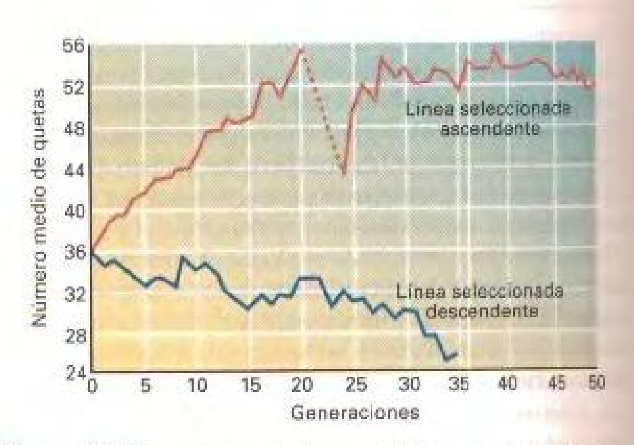


Figura 24-12. Cambios del número medio de quetas en dos poblaciones de laboratorio de *Drosophila melanogaster* mediante selección artificial para alto número de quetas en una población y para bajo número de quetas en la otra. El segmento discontinuo de la línea seleccionada ascendente indica un período de cinco generaciones en las cuales no se llevó a cabo selección (De K. Mather y B. J. Harrison, «The Manifold Effects of Selection», *Heredity* 3, 1949, 1.)

RECUADRO 24-8 El balance entre selección y mutación

Si llamamos q a la frecuencia del alelo deletéreo a, y $p = 1 - q$ a la frecuencia del alelo normal, el cambio en la frecuencia alélica debido a la tasa de mutación μ es

$$\Delta q_{mut} = \mu p$$

Un modo sencillo de expresar la aptitud de un alelo deletéreo recesivo es $W_{A/A} = W_{A/a} = 1$ y $W_{a/a} = 1 - s$, donde s representa la pérdida de aptitud de los homocigotos recesivos. Podemos sustituir ahora estas aptitudes en nuestra expresión general del cambio de la frecuencia alélica (véase Recuadro 24-6) y obtener

$$\Delta q_{sel} = \frac{pq(sq)}{1 - sq^2}$$

Alcanzar el equilibrio implica que el incremento de la frecuencia alélica debido a la mutación debe equilibrarse exactamente con la disminución de la frecuencia alélica debida a la selección, de modo que

$$\Delta \hat{q}_{mut} + \Delta \hat{q}_{sel} = 0$$

Recordemos que, en el equilibrio, $\hat{q}$ será muy pequeña, por lo cual $1 - s\hat{q}^2 \cong 1$, por lo que sustituyendo en la fórmula anterior $\Delta \hat{q}_{mut}$ y $\Delta \hat{q}_{sel}$ por sus expresiones, tendremos

$$\mu \hat{p} - \frac{s\hat{p}\hat{q}^2}{1 - s\hat{q}^2} \simeq \mu \hat{p} - s\hat{p}\hat{q}^2 = 0$$

o

$$q^2 = \frac{\mu}{s} \quad \text{y} \quad \hat{q} = \sqrt{\frac{\mu}{s}}$$

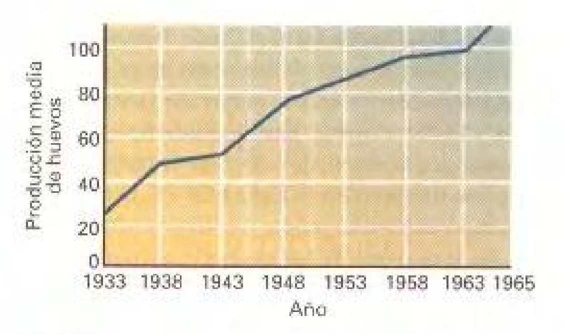


Figura 24-13. Cambios en la producción media de huevos en una población de gallinas seleccionada durante un período de 30 años para que aumentara el ritmo de la puesta de huevos (De I. M. Lerner y W. J. Libby, *Heredity, Evolution and Society*, 2.ª ed. Copyright © 1976 de W. H. Freeman and Company. Los datos son cortesía de D. C. Lowry).

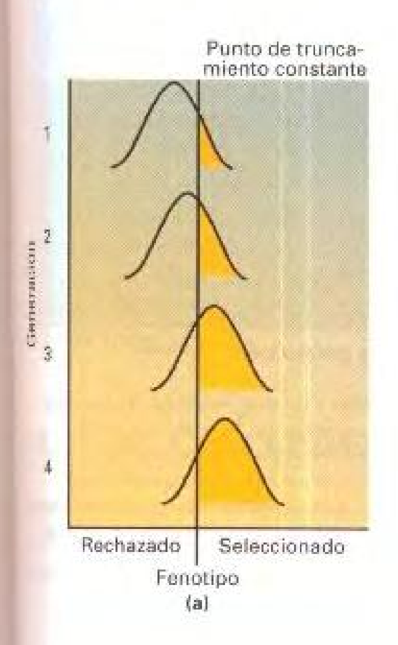
(independientemente de cuáles sean sus familias), se mide una muestra y sólo aquellos individuos por encima (o por debajo) de un valor fenotípico determinado (el punto de truncamiento) se eligen como progenitores para la siguiente generación. Este valor fenotípico puede ser constante a lo largo de sucesivas generaciones; entonces la selección es por **truncamiento constante**. Más común es la elección de un determinado porcentaje de la población correspondiente a los valores más altos (o más bajos) del carácter seleccionado; entonces la selección es por **truncamiento proporcional**. Con el truncamiento constante, la intensidad de la selección disminuye con el tiempo a medida que más y más miembros de la población superan el punto constante de truncamiento. Con el truncamiento proporcional, la intensidad de la selección es constante, pero el punto de truncamiento se desplaza hacia los valores más altos conforme se mueve la distribución de la población. La Figura 24-14 ilustra estos dos tipos de truncamiento.

Una experiencia común en los programas de selección artificial es que, conforme se hace más extrema la población, su viabilidad y fertilidad disminuyen. Como resultado, al final no se harían más progresos en la selección, independientemente de la varianza genética del carácter, porque los individuos seleccionados no se reproducen. La pérdida de aptitud puede ser un efecto fenotípico de los genes para el carácter seleccionado, en cuyo caso no puede hacerse mucho más para seguir mejorando la población. A menudo, sin embargo, la pérdida de aptitud está vinculada a alelos de esterilidad en genes ligados que se «arrastran» con los loci seleccionados. En tales casos, unas cuantas generaciones sin selección permitirían que se formaran recombinantes, y la selección puede continuarse después, como en la línea seleccionada para aumentar el número de quetas de la Figura 24-12.

Debemos ser muy cuidadosos en nuestra interpretación de los programas agrícolas de selección a largo plazo. En el mundo real de la agricultura, junto a la producción de variedades genéticamente mejoradas se han producido cambios en los métodos de cultivo, maquinaria, fertilizantes, insecticidas, herbicidas y demás. Los aumentos de la producción media de las cosechas se deben a todos estos cambios en su conjunto. Por ejemplo, la producción media de maíz en los Estados Unidos aumentó de 40 a 80 *bushels* por acre entre 1940 y 1970 (Un *bushel* es una unidad de capacidad para sólidos empleada en los países anglosajones; en EE.UU. equivale a 35,24 litros, y en GB a 36,37 litros). Pero los experimentos que compararon las variedades nuevas y antiguas del maíz en ambientes comunes muestran que sólo alrededor de la mitad de este aumento es resultado directo del empleo de nuevas variedades (la otra mitad se debe a la mejora de las técnicas agrícolas). Además, las nuevas variedades son superiores a las antiguas sólo en las elevadas densidades de cultivo de las plantaciones modernas para las que fueron seleccionadas.

Sucesos aleatorios

Si una población tiene un tamaño finito (como todas las poblaciones lo tienen) y si una determinada pareja de progenitores



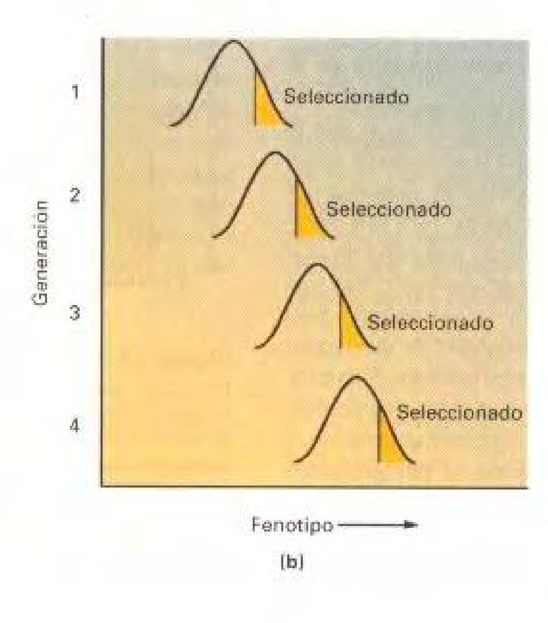


Figura 24-14. Dos esquemas de selección por truncamiento para un carácter de variación continua: (a) truncamiento constante; (b) truncamiento proporcional.

deja poca descendencia, la frecuencia de un alelo no se verá exactamente reproducida en la siguiente generación, ni siquiera en ausencia de fuerzas selectivas, debido a que se producen errores de muestreo. Si en una población de 1000 individuos la frecuencia de a es de 0.5 en una generación, puede muy bien, por azar, ser 0.493 o 0.505 en la siguiente generación, por la producción fortuita de unos cuantos más o unos cuantos menos descendientes de cada genotipo. En la segunda generación habrá otro error de muestreo basado en la nueva frecuencia alélica, de modo que la frecuencia de a puede subir desde 0.505 a 0.511 o bajar a 0.498. Este proceso de fluctuación aleatoria continúa generación tras generación, sin que ninguna fuerza «empuje» hacia el estado inicial, porque la población no tiene «memoria genética» del estado en que se encontraba muchas generaciones atrás. Cada generación constituye un suceso independiente. El resultado final de estos cambios aleatorios de las frecuencias alélicas es que la población, al final, deriva a $p = 1$ o $p = 0$. Tras este punto, no hay cambio posible; la población se ha hecho homocigótica. Una población diferente, aislada de la primera, también sufre esta **deriva genética aleatoria**, pero puede convertirse en homocigótica para el alelo A, mientras que la primera población se hizo homocigótica para el alelo a. Con el paso del tiempo, las poblaciones aisladas se diferencian entre sí, perdiendo heterocigosidad cada una de ellas. La variación presente originalmente *en* la población aparece ahora como variación *entre* poblaciones.

Una forma de deriva genética ocurre cuando un pequeño grupo se separa de una población mayor y funda una nueva colonia. Esta «deriva aguda», denominada **efecto fundador**, tiene lugar en una sola generación de muestreo, seguida de varias generaciones en las que la población sigue siendo pequeña. El efecto fundador es probablemente responsable de la pérdida virtualmente completa del grupo sanguíneo B en los indios americanos, cuyos antepasados llegaron en número muy pequeño a través del estrecho de Bering al final de la última glaciación, aproximadamente hace 20 000 años.

El proceso de deriva genética debería sernos familiar. Es, de hecho, otro modo de ver el efecto de la endogamia en los grupos pequeños, discutido anteriormente. Tanto si tiene que ver con la endogamia o con los errores de muestreo de los genes, el efecto es el mismo. Las poblaciones no reproducen exactamente sus constituciones genéticas; hay un componente aleatorio en el cambio de las frecuencias alélicas.

Una consecuencia del muestreo aleatorio de alelos es que la mayoría de las nuevas mutaciones, incluso si no actúa la selección en su contra, nunca entran en la población. Supongamos que un individuo determinado es heterocigótico para una mutación nueva. Hay una posibilidad de que dicho individuo no deje descendencia alguna. Incluso si tiene un descendiente, hay una probabilidad de $\frac{1}{2}$ de que la nueva mutación no se transmita. Si el individuo deja dos descendientes, la probabilidad de que ninguno de ellos lleve la mutación es $\frac{1}{4}$, y así sucesivamente. Supongamos que la nueva mutación se transmite con éxito a su descendencia. Entonces la lotería se repite en la siguiente generación, y otra vez puede perderse el alelo. De hecho, si una población tiene un tamaño N, la probabilidad de que una nueva mutación se pierda por puro azar es $(2N - 1)/2N$ (para más detalles de esta derivación, que está fuera del alcance de este libro, véanse los capítulos 2 y 3 del libro de Hartl y Clark, *Principles of Population Genetics*). Pero si la nueva mutación no se pierde, la única cosa que puede sucederle en una población finita es que al final se extienda y llegue a fijarse. Este hecho tiene una probabilidad de $\frac{1}{2N}$. Entonces, en ausencia de selección, la historia de la población se representa como en la Figura 24-15. Durante algún período de tiempo es homocigótica, y entonces aparece una nueva mutación. En la mayoría de los casos el nuevo alelo mutante se perderá inmediatamente, o poco después de su aparición. Ocasionalmente, sin embargo, el nuevo alelo mutante deriva a través de la población y ésta se hace homocigótica para el nuevo alelo. El proceso comienza entonces de nuevo.

Incluso una mutación nueva que sea seleccionada de forma ligeramente favorable se perderá normalmente en las primeras generaciones tras su aparición en la población, víctima de la deriva genética. Si una nueva mutación tiene una ventaja selectiva s en el heterocigoto en el cual aparece, sólo hay una probabilidad $2s$ de que el alelo se imponga en la población. Así, una mutación que sea 1 % más apta que el alelo normal de la población se perderá el 98 % de las veces por deriva genética.

COROLARIO

Las mutaciones nuevas pueden quedar fijadas en una población, incluso aunque no estén favorecidas por la selección natural, simplemente por un proceso de deriva genética aleatoria. Incluso mutaciones nuevas que sean favorables se pierden con cierta frecuencia.

Otra consecuencia de la interacción del azar y las fuerzas selectivas es que la efectividad de estas fuerzas selectivas en la dirección de la composición de la población depende del tamaño de ésta. La magnitud del efecto aleatorio es inversamente proporcional al tamaño de la población, $1/N$, mientras que la magnitud de una fuerza determinista depende de la tasa de migración, m, o la tasa de mutación, μ, o el coeficiente de selección, s.



Figura 24-15. Aparición, pérdida y eventual incorporación de nuevas mutaciones durante la existencia de una población. Si la deriva genética aleatoria no provoca la pérdida de una nueva mutación, entonces debe provocar finalmente que la población entera se haga homocigótica para la mutación (en ausencia de la selección). En la figura han aparecido 10 mutaciones de las cuales 9 aumentaron ligeramente de frecuencia para luego desaparecer. Sólo la cuarta mutación se extendió finalmente en la población (De J. Crow y M. Kimura, *An Introduction to Population Genetics Theory*. Copyright © 1970 de Harper & Row.)

Grosso modo, podemos decir que la mutación y la migración son efectivas si

$$m \gg \frac{1}{N} \quad \text{o} \quad \mu > \frac{1}{N}$$

es decir, si

$$Nm \gg 1 \quad \text{o} \quad N\mu > 1$$

Lo mismo es válido para la selección; la selección es efectiva sólo si $Ns \gg 1$. Cuando Ns tiene un valor pequeño porque la selección es débil o el tamaño de la población es escaso, entonces las mutaciones son *efectivamente neutras*, incluso aunque exista cierta selección sobre ellas. Las poblaciones pequeñas se verán menos afectadas por la selección que las poblaciones grandes, incluso bajo idénticas condiciones respecto a los demás parámetros evolutivos. Por ejemplo, las poblaciones humanas se han mantenido muy pequeñas a lo largo de casi toda la historia de nuestra especie, habiendo crecido solamente durante los últimos cientos de generaciones. Por eso, podríamos encontrar que muchas mutaciones, que actualmente se encuentran bajo presión selectiva, fueron efectivamente neutras durante muchísimo tiempo y pueden haber alcanzado frecuencias altas simplemente por mero azar.

RESUMEN

El estudio de los cambios dentro de una población, o Genética de poblaciones, vincula los cambios heredables que se dan en las poblaciones de organismos con los procesos subyacentes de herencia y desarrollo que tienen lugar en el plano individual. La Genética de poblaciones es el estudio de la herencia de la variación, y de cómo se modifica ésta en el tiempo y en el espacio.

La variación heredable que se puede identificar dentro de una población se puede estudiar mediante la observación de diferencias morfológicas entre individuos, examinando las diferencias en aminoácidos de secuencias polipeptídicas concretas, o incluso examinando, desde hace menos tiempo, las variaciones en las secuencias nucleotídicas del DNA. Este tipo de observaciones condujeron a la conclusión de que existe, dentro de la población, un polimorfismo considerable en muchos loci. Una medida de esta variación es la cuantía de la heterocigosidad presente en la población. Los estudios de las poblaciones han mostrado que, en general, las diferencias genéticas entre individuos dentro de cada raza humana son mucho mayores que la diferencia promedio entre razas.

El origen último de toda variación es la mutación. Sin embargo, la frecuencia cuantitativa de los genotipos concretos de la población puede variar por recombinación, inmigración de alelos, sucesivos hechos de mutación y por la acción del azar.

Una de las propiedades de la segregación mendeliana es que los apareamientos al azar conducen a un equilibrio en la distribución de genotipos una generación tras otra. Sin embargo, la endogamia es un proceso que convierte la variación genética existente dentro de la población en variación entre poblaciones, convirtiendo a cada población separada en homocigótica para un alelo particular distinto, «elegido» aleatoriamente. Por otra parte, en la mayoría de las poblaciones se alcanza un equilibrio en cualquier medio ambiente entre endogamia, mutación de un alelo a otro e inmigración.

Los cambios «dirigidos» de las frecuencias alélicas dentro de la población tienen lugar por medio de la selección natural de los genotipos favorecidos. En muchos casos, tales cambios conducen a la homocigosis de un locus específico. Pero por otro lado, el heterocigoto podría estar mejor adecuado a un medio ambiente dado que cualquiera de los homocigotos, lo que llevaría a un polimorfismo balanceado.

Sin embargo, la selección medioambiental de genotipos específicos rara vez es así de simple. Lo más habitual es que los fenotipos estén determinados por varios genes que interaccionan entre sí, por lo que los alelos en estos diferentes loci estarán sometidos a tasas de selección distintas. Además, pueden verse afectados loci sin relación directa con el fenotipo en cuestión, pero estrechamente ligados a los que lo determinan. Si un alelo de un gen relacionado con el fenotipo es seleccionado positivamente, puede «arrastrar» durante el proceso de selección a alelos específicos de un locus no relacionado con el fenotipo. En general, la variación genética es el resultado de la interacción de las fuerzas evolutivas. Por ejemplo, un alelo recesivo y deletéreo puede que nunca se elimine totalmente de una población particular porque el proceso de mutación lo reintroduzca continuamente en dicha población. La inmigración también puede reintroducir un alelo «indeseable» en la población. Y, además, un alelo deletéreo puede ser seleccionado bajo condiciones ambientales que desconocemos (lo que incluye el resto de la dotación genética del individuo).

A menos que los alelos alternativos aparezcan con frecuencias intermedias, la selección es muy lenta (al menos contra los alelos recesivos) por lo que requiere numerosas generaciones. En muchas poblaciones, especialmente las de pequeño tamaño, se pueden fijar nuevas mutaciones incluso aunque no se vean favorecidas por la selección natural, simplemente mediante un proceso de deriva genética aleatoria.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

frecuencia alélica / heterocigosidad / polimorfismo / mutación / selección / equilibrio Hardy-Weinberg / inmigración / endogamia / deriva genética / proporciones mendelianas

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

En el caracol *Cepaea nemoralis*, los polimorfismos en el color del caparazón (amarillo o rosa) y la presencia o ausencia en él de bandas son el resultado de un par de alelos que segregan en loci distintos. Diseñe un programa experimental que ponga de manifiesto las fuerzas que determinan la frecuencia y la distribución geográfica de esos polimorfismos.

♦ Solución ♦

a. Hay que hacer una descripción de las frecuencias de las diferentes formas en un gran número de poblaciones que cubran un amplio espectro geográfico y ecológico de la especie. Cada caracol debe analizarse para *ambos* polimorfismos. Al mismo tiempo, hay que hacer una descripción del hábitat de cada población. Además, debe hacerse una estimación del número de caracoles de cada población.

b. Se marca una muestra de caracoles con una mancha de pintura en el caparazón y se devuelven a la población, para tomarlos de nuevo al cabo de algún tiempo y estimar así la distancia a la que pueden migrar.

c. Si podemos criar los descendientes de caracoles hembras, podemos inferir los genotipos de los parentales machos, de modo que comprobaríamos si se producen o no cruzamientos al azar. Las frecuencias de los distintos fenotipos que segregan dentro de *cada* familia revelarán posibles diferencias entre genotipos respecto a la probabilidad de sobrevivir durante las etapas tempranas del desarrollo.

d. Otras pruebas de la existencia de selección pueden obtenerse a partir de: (1) «clinas» geográficas en la frecuencia de los alelos; (2) correlación entre frecuencias de alelos y variables ecológicas, incluyendo la densidad de la población; (3) correlación entre las frecuencias de los dos polimorfismos (por ejemplo, ¿se caracterizan las poblaciones con una elevada frecuencia de caparazones de color rosa por tener una frecuencia elevada de bandas?); (4) asociaciones no aleatorias de los alelos de ambos loci *dentro* de las poblaciones, indicando si alguna de las combinaciones tiene una mayor aptitud.

e. Si comparamos la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones pequeñas con la variación entre poblaciones grandes, podemos obtener pruebas de la importancia de la deriva genética. Si las poblaciones pequeñas difieren entre sí más que las grandes, entonces se están produciendo efectos de deriva.

PROBLEMAS RESUELTOS

1. Alrededor del 70 % de los norteamericanos blancos pueden percibir el sabor de la sustancia química feniltiocarbamida, y los restantes no pueden. La capacidad para percibir el sabor está determinada por el alelo dominante *T*, y la incapacidad para percibirlo, por el alelo recesivo *t*. Suponiendo que la población está en equilibrio Hardy-Weinberg, ¿cuáles son las frecuencias genotípicas y alélicas de la población?

♦ Solución ♦

Puesto que el 70 % son perceptores (*T/T*), el 30 % deben ser no perceptores (*t/t*). Esta frecuencia de homocigotos recesivos es igual a q^2, así que para obtener q basta simplemente con calcular la raíz cuadrada de 0.30:

$$q = \sqrt{0.30} = 0.55$$

Como $p + q = 1$, podemos escribir

$$p = 1 - q = 1 - 0.55 = 0.45$$

Y ahora podemos obtener

$$p^2 = 0.45^2 = 0.20\ (T/T)$$
$$2pq = 2 \times 0.45 \times 0.55 = 0.50\ (T/t)$$
$$q^2 = 0.3\ (t/t)$$

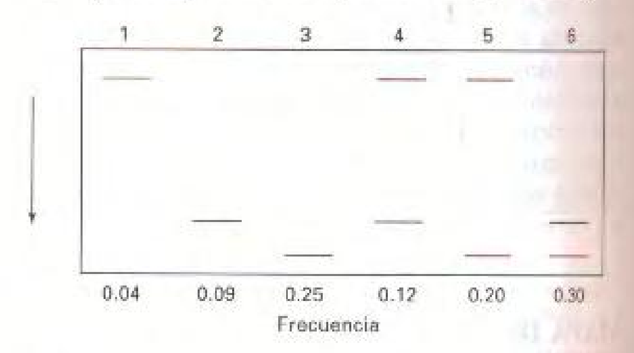
2. En una gran población natural de *Mimulus guttatus* se tomó una hoja de cada individuo de una larga serie de plantas. Las hojas se machacaron y se sometieron a electroforesis en gel. A continuación, se detectó en el gel la presencia de cierta actividad enzimática específica X. Se observaron seis patrones diferentes de bandas, con las frecuencias que se muestran en el diagrama.

   a. Suponiendo que estos patrones están determinados por un único locus, proponga una explicación genética de los seis tipos.

   b. ¿Cómo se podría comprobar esta explicación?

   c. ¿Cuáles son las frecuencias alélicas de esa población?

   d. ¿Está la población en equilibrio Hardy-Weinberg?



♦ Solución ♦

a. El examen del gel revela que las bandas ocupan sólo tres posiciones: las llamaremos lenta, intermedia y rápida. Además,

cada individuo presenta una o dos bandas. La explicación más sencilla es que hay un locus con tres alelos (los llamaremos A^L, A^I y A^R) y que los individuos con dos bandas son heterocigóticos. De ahí que 1 = *L/L*, 2 = *I/I*, 3 = *R/R*, 4 = *L/I*, 5 = *L/R*, 6 = *I/R*.

b. La hipótesis puede comprobarse realizando cruzamientos controlados. Por ejemplo, de la autofecundación del tipo 5 podemos predecir $\frac{1}{4}$ *L/L*, $\frac{1}{2}$ *L/R* y $\frac{1}{4}$ *R/R*.

c. Las frecuencias pueden calcularse mediante una sencilla ampliación de las fórmulas para dos alelos:

$$f(L) = 0.04 + \tfrac{1}{2}(0.12) + \tfrac{1}{2}(0.20) = 0.20$$

$$f(I) = 0.09 + \tfrac{1}{2}(0.12) + \tfrac{1}{2}(0.30) = 0.30$$

$$f(R) = 0.25 + \tfrac{1}{2}(0.20) + \tfrac{1}{2}(0.30) = 0.50$$

d. Las frecuencias genotípicas del equilibrio Hardy-Weinberg son

$$(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr =$$

$$= 0.04 + 0.09 + 0.25 + 0.12 + 0.20 + 0.30$$

que son precisamente las frecuencias observadas, así que parece que la población está en equilibrio.

3. En una gran población experimental de *Drosophila*, se calcula que la aptitud de un fenotipo recesivo es 0.9 y que la tasa de mutación hacia el alelo recesivo es 5×10^{-5}. Si se permite que la población alcance el equilibrio, ¿cuáles serán las frecuencias alélicas?

♦ Solución ♦

En este caso, la selección y la mutación trabajan en direcciones opuestas, de modo que se predice un equilibrio. Tal equilibrio se describe mediante la fórmula

$$\hat{q} = \sqrt{\frac{\mu}{s}}$$

En este problema $\mu = 5 \times 10^{-5}$ y $s = 1 - W = 1 - 0.9 = 0.1$. Por tanto

$$\hat{q} = \sqrt{\frac{5 \times 10^{-5}}{10^{-1}}} = 2.2 \times 10^{-2} = 0.022$$

$$\hat{p} = 1 - 0.022 = 0.978$$

PROBLEMAS

1. ¿Qué fuerzas pueden cambiar la frecuencia de un alelo en una población?

2. En una población de ratones hay dos alelos del locus *A* (*A1* y *A2*). Se comprueba que en dicha población hay 384 ratones de genotipo *A1/A1*, 210 de genotipo *A1/A2* y 260 de genotipo *A2/A2*. ¿Cuáles son las frecuencias de los dos alelos en la población?

3. En una población de laboratorio de *Drosophila* en la que las moscas se cruzan al azar, el 4 % son de cuerpo negro (el color negro está determinado por un alelo autosómico recesivo *b*) y el 96 % son de color marrón (color normal especificado por el alelo dominante *B*). Suponiendo que esta población está en equilibrio Hardy-Weinberg, ¿cuáles son las frecuencias alélicas de *B* y *b*? ¿y las frecuencias genotípicas de *B/B* y *B/b*?

4. En una población, la tasa de mutación $D \rightarrow d$ es 4×10^{-6}. Si hoy $p = 0.8$, ¿cuál será el valor de p tras 50 000 generaciones?

5. Supongamos que estamos estudiando un polimorfismo proteico en una población natural de cierta especie de un organismo haploide que se reproduce sexualmente. Conseguimos aislar muchas estirpes en varias partes del área de estudio y realizamos pruebas de electroforesis en gel con un extracto de cada estirpe. Los geles se tiñen con un reactivo específico para la enzima X, encontrándose que en la población hay un total de 5 variantes electroforéticas de esta enzima. La hipótesis es que estas variantes representan varios alelos del gen de la enzima X.

   a. ¿Como se demostraría que esto es así, tanto genética como bioquímicamente? (Se pueden llevar a cabo cruzamientos, obtener diploides, realizar electroforesis, probar actividades enzimáticas, averiguar secuencias de aminoácidos, etc.). Indique con precisión los pasos y las conclusiones.

   b. Enuncie al menos otra forma posible de generar las diferentes variantes electroforéticas, e indique cómo distinguiría esa posibilidad de la descrita anteriormente.

6. Un estudio realizado en 1958 en la ciudad minera de Ashibetsu, en la provincia japonesa de Hokkaido, reveló las frecuencias de los genotipos de los grupos sanguíneos MN (para individuos y para parejas casadas) que se muestran en la siguiente tabla:

Genotipo		Número de individuos o parejas
Individuos		
L^M/L^M		406
L^M/L^N		744
L^N/L^N		332
	Total	1482
Parejas		
$L^M/L^M \times L^M/L^M$		58
$L^M/L^M \times L^M/L^N$		202
$L^M/L^N \times L^M/L^N$		190
$L^M/L^M \times L^N/L^N$		88
$L^M/L^N \times L^N/L^N$		162
$L^N/L^N \times L^N/L^N$		41
	Total	741

   a. Compruebe si la población está o no en equilibrio Hardy-Weinberg con respecto a los tipos sanguíneos MN.

b. Compruebe si los emparejamientos son al azar respecto a los tipos sanguíneos MN.

(El problema 6 es de J. Kuspira y G.W. Walker, *Genetics: Questions and Problems*. Copyright © 1973 por McGraw-Hill.)

7. Considere las poblaciones que tienen los genotipos que aparecen en el Cuadro siguiente

Población	*A/A*	*A/a*	*a/a*
1	1.0	0.0	0.0
2	0.0	1.0	0.0
3	0.0	0.0	1.0
4	0.50	0.25	0.25
5	0.25	0.25	0.50
6	0.25	0.50	0.25
7	0.33	0.33	0.33
8	0.04	0.32	0.64
9	0.64	0.32	0.04
10	0.986049	0.013902	0.000049

a. ¿Qué poblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg?

b. ¿Cuánto valen p y q en cada población?

c. En la población 10 se descubre que la tasa de mutación $A \rightarrow a$ es 5×10^{-6} y que la mutación inversa es despreciable. ¿Cuál debe ser la aptitud del fenotipo *a/a*?

d. En la población 6, el alelo *a* es deletéreo. Además, el alelo *A* muestra dominancia incompleta, de modo que *A/A* es perfectamente apto, *A/a* tiene una aptitud de 0.8 y *a/a* de 0.6. Si no hay mutación, ¿cuánto valdrán p y q en la siguiente generación?

8. La ceguera para los colores está provocada por un alelo recesivo ligado al sexo. Uno de cada 10 varones es ciego para los colores.

a. ¿Cuál es la proporción de mujeres ciegas para los colores?

b. ¿En qué proporción es la ceguera para los colores más frecuente entre los hombres? (o bien, ¿cuántos varones ciegos para los colores hay por cada mujer ciega para los colores?)

c. ¿En qué proporción de los matrimonios afectará la ceguera para los colores a la mitad de los hijos de cada sexo?

d. ¿Cuál será la proporción de matrimonios en los que todos los hijos serán normales?

e. En una población que no está en equilibrio, la frecuencia del alelo para la ceguera es 0.2 entre las mujeres y 0.6 entre los varones. Tras una generación de cruzamientos aleatorios, ¿qué proporción de la descendencia femenina será ciega para los colores? ¿Y qué proporción de la descendencia masculina?

f. ¿Cuáles serán las frecuencias alélicas en la descendencia masculina y femenina del apartado e?

(El problema 8 es cortesía de Clayton Person.)

9. En una población silvestre de escarabajos de la especie X, se observa que las cubiertas de las alas son brillantes o mates en una proporción 3:1 ¿Prueba esto que el carácter brillante es dominante? (Supongamos que los dos estados están causados por dos alelos de un gen). De no ser así, ¿qué prueba? ¿Cómo se aclararía la situación?

10. Parece claro que la mayoría de las mutaciones son deletéreas. ¿Por qué?

11. La mayoría de las mutaciones son recesivas frente al alelo silvestre. Entre las raras mutaciones que son dominantes, por ejemplo en *Drosophila*, la mayoría resultan ser aberraciones cromosómicas o son inseparables de aberraciones de este tipo. ¿Puede explicar por qué el alelo silvestre es normalmente dominante?

12. El 10 % de los varones de una población grande en la que los cruzamientos tienen lugar al azar son ciegos para los colores. Un grupo de 1000 individuos, representativo de la población, emigra a una isla del sur del Pacífico, donde ya hay 1000 habitantes, de los cuales el 30 % de los varones son ciegos para los colores. Suponiendo que el equilibrio Hardy-Weinberg se cumple en todos los casos (en las dos poblaciones originales antes de la migración y en la población mixta inmediatamente después de la migración), ¿qué fracción de los varones y las hembras se espera que sean ciegos para los colores en la generación inmediatamente siguiente a la llegada de los inmigrantes?

13. Mediante pedigríes, encuentre la probabilidad de homocigosis por consanguinidad de la descendencia de (a) parejas progenitor-descendiente; (b) parejas de primos hermanos; (c) parejas de tío-sobrina o tía-sobrino.

14. En un estudio sobre las tribus indias de Arizona y Nuevo México, se encontró que no había albinos o eran muy raros en la mayoría de los grupos (hay un albino por cada 20 000 americanos caucásicos). Sin embargo, en tres poblaciones de indios, las frecuencias de albinos son excepcionalmente altas: uno de cada 277 indios de Arizona; uno de cada 140 indios Jemez de Nuevo México, y uno de cada 247 indios Zuni de Nuevo México. Las tres poblaciones están relacionadas cultural pero no lingüísticamente. ¿Qué factores pueden explicar la alta incidencia de albinos en estas tres tribus?

15. En una población de animales, el 20 % de los individuos son *A/A*, el 60 % son *A/a* y el 20 % son *a/a*. ¿Cuáles son las frecuencias alélicas? En esta población cada cruzamiento ocurre siempre *entre fenotipos parecidos*, pero en cada grupo fenotípico es al azar. ¿Qué frecuencias genotípicas y alélicas prevalecerán en la siguiente generación? Este tipo de apareamiento discriminatorio es común en las poblaciones animales. Otro tipo de apareamiento discriminatorio es el que se da sólo *entre fenotipos distintos*: conteste a la pregunta anterior si se impone esta restricción. ¿Cuál será el resultado final después de muchas generaciones de ambos tipos de apareamientos?

16. En *Drosophila*, una estirpe aislada de la naturaleza presenta una media de 36 quetas abdominales. Cruzando selectivamente las moscas con mayor número de quetas, la media aumenta a 56 en 20 generaciones. ¿Cuál es la fuente de esta flexibilidad genética? La estirpe de 56 quetas es estéril, así que relajamos la selección durante varias generaciones y el número de quetas desciende hasta unas 45. ¿Por qué no desciende de nuevo hasta 36? Cuando se vuelve a aplicar de nuevo la selección, se alcanzan pronto las 56 quetas, pero esta vez la estirpe *no* es estéril. ¿Cómo puede originarse esta situación?

17. Las aptitudes de tres genotipos son $W_{A/A} = 0.9$, $W_{A/a} = 1.0$, y $W_{a/a} = 0.7$.

a. Si la población comienza con una frecuencia alélica $p = 0.5$, ¿cuál será el valor de p en la siguiente generación?

b. ¿Cuál es la frecuencia alélica predecible en el equilibrio?

18. Los individuos *A/A* y *A/a* tienen igual fertilidad. Si el 0.1 % de la población es *a/a* ¿qué presión de selección existe contra *a/a* si la tasa de mutación $A \rightarrow a$ es de 10^{-5}?

19. El alelo *B* es autosómico dominante y deletéreo. La frecuencia de los individuos afectados es de 4×10^{-6}. La capacidad reproductiva de estos individuos es de alrededor del 30 % de los individuos no afectados. Calcule μ, la tasa a la cual los alelos *b* mutan hacia su alelo deletéreo *B*.

20. De 31 hijos nacidos de parejas padre-hija, 6 murieron al poco tiempo de nacer, 12 fueron muy anormales y murieron en la infancia, y 13 fueron normales. Usando esta información, calcule aproximadamente cuántos alelos letales recesivos hay, como promedio, en nuestros genomas humanos. Por ejemplo, si la respuesta es 1, entonces una hija tendría una probabilidad del 50 % de llevar el alelo, y la probabilidad de la combinación letal producida por la unión sería de $\frac{1}{2} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{8}$ (así que, obviamente la respuesta no es 1). Considere también la posibilidad de muertes no detectadas *in* útero en tales parejas. ¿Cómo afectarían al resultado?

21. Si definimos el **coste total de la selección** de una población de alelos recesivos deletéreos como la pérdida de aptitud por individuo afectado (s) multiplicada por la frecuencia de individuos afectados (q^2), entonces

$$\text{Coste genético} = sq^2$$

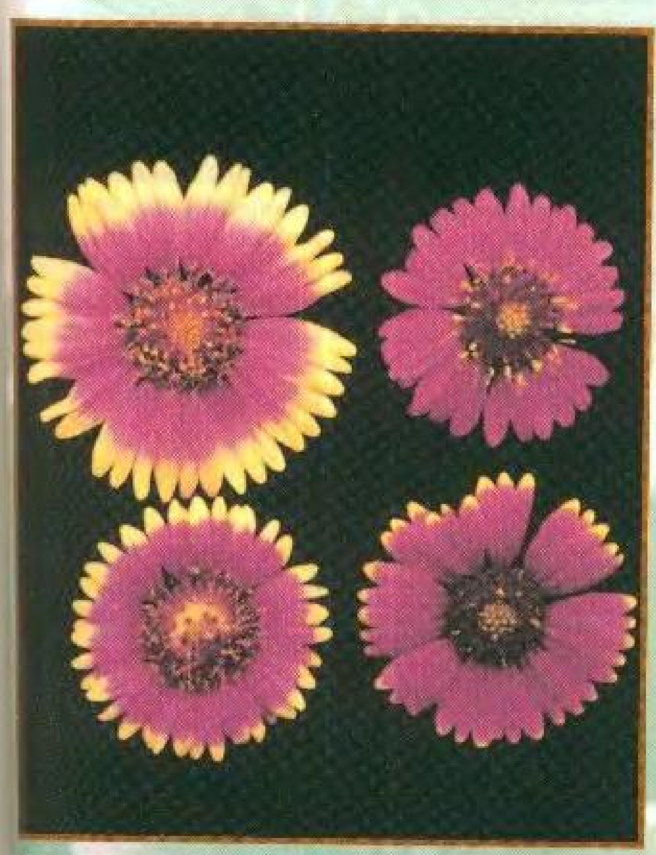
a. Supongamos una población que está en equilibrio entre mutación y selección para un alelo recesivo deletéreo, donde $s = 0.5$ y $\mu = 10^{-5}$. ¿Cuál es la frecuencia de equilibrio del alelo? ¿Cuál es el coste genético?

b. Supongamos que empezásemos a irradiar miembros individuales de la población, de modo que la tasa de mutación se duplicara. ¿Cuál será la nueva frecuencia de equilibrio del alelo? ¿Cuál será el nuevo coste genético?

c. Si no cambiamos la tasa de mutación sino que, en su lugar, rebajamos la intensidad de la selección a $s = 0.3$, ¿qué sucede con la frecuencia de equilibrio y con el coste genético?

25

GENÉTICA CUANTITATIVA



Flores compuestas de *Gaillardia pulchella*. Variación cuantitativa del color y diámetro de la flor, y del número de partes florales. *(J. Heywood, Journal of Heredity, mayo/junio 1986.)*

Ideas fundamentales

En las poblaciones naturales, la variación de la mayoría de los caracteres aparece en forma de un espectro fenotípico continuo, más que como clases fenotípicas discretas. En otras palabras, la variación es cuantitativa, no cualitativa.

Es extremadamente difícil aplicar el análisis genético mendeliano a tales distribuciones fenotípicas continuas, de modo que en su lugar se emplean técnicas estadísticas.

Uno de los principales objetivos de la Genética cuantitativa es determinar de qué modo interaccionan los genes con el medio ambiente para contribuir a que se genere la distribución de un rasgo cuantitativo determinado.

La variación genética subyacente a la distribución continua de un carácter puede ser el resultado de la segregación de un solo locus genético o de numerosos loci que interaccionan y producen efectos acumulativos sobre el fenotipo.

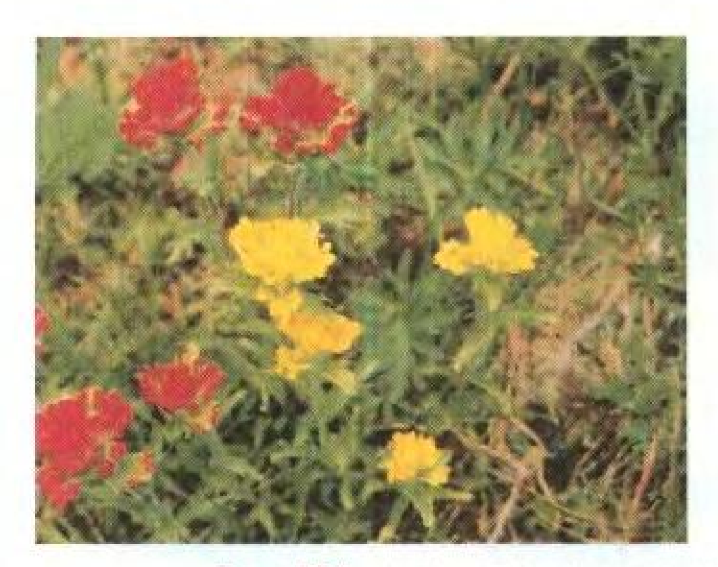
La relación estimada entre variación genética y variación ambiental *no* es una medida de la contribución relativa de los genes y el ambiente al fenotipo.

Las estimaciones de la varianza genética y ambiental son aplicables sólo a una población determinada y al conjunto particular de condiciones ambientales en las que se han realizado tales estimaciones.

En última instancia, el objetivo de la Genética es el análisis del genotipo de los organismos. No obstante, el genotipo puede identificarse y, por consiguiente estudiarse, únicamente a través de su efecto fenotípico. Podemos reconocer dos genotipos como diferentes porque los fenotipos de sus portadores son distintos. Por tanto, los experimentos genéticos básicos dependen de la existencia de una relación simple entre genotipo y fenotipo. Ésta es la razón de que los estudios de las secuencias de DNA sean tan importantes, ya que a partir de ese fenotipo, el más básico de todos, podemos leer el genotipo de forma directa y completa. En general, esperamos encontrar un único fenotipo distinguible para cada genotipo y un único genotipo simple para cada fenotipo. En el peor de los casos, cuando un alelo es completamente dominante, puede ser necesario realizar un cruzamiento genético sencillo para distinguir el organismo heterocigoto del homocigoto. Cuando es posible, los genetistas evitan estudiar genes que tienen sólo penetrancia incompleta y expresividad variable (Cap. 4), debido a la dificultad de hacer inferencias genéticas a partir de tales rasgos. Piense cuán difícil (si no imposible) le hubiera resultado a Benzer estudiar la estructura fina del gen en fagos, si el efecto de las mutaciones *rII* hubiera sido una reducción sólo del 5 % de la capacidad del silvestre de crecer en *E. coli* K. De ahí que, en su mayor parte, el estudio de la Genética descrito en los capítulos anteriores haya sido en realidad el estudio de sustituciones alélicas que provocan diferencias fenotípicas *cualitativas*.

Sin embargo, la variación real entre individuos es generalmente cuantitativa, no cualitativa. Las plantas de trigo de un campo cultivado, o los cardos silvestres al borde de una carretera, no pueden clasificarse nítidamente en las categorías de «alto» y «bajo» en mayor medida que podrían clasificarse los seres humanos en las categorías de «blanco» y «negro». La altura, el peso, la forma, el color, la actividad metabólica, la tasa reproductora y el comportamiento son características que varían de forma más o menos continua dentro de un intervalo (Fig. 25-1). Incluso cuando el carácter es intrínsecamente contable (como el número de facetas de los ojos o el de cerdas de *Drosophila*), el número de clases distinguibles puede ser tan grande que la variación sea casi continua. Si tenemos en cuenta los individuos extremos, digamos una planta de maíz de 2.5 m de altura y otra de 1 m, el cruzamiento entre ellas no dará un resultado mendeliano. Tal cruzamiento producirá plantas de unos 2 m de altura, con claras variaciones entre distintas plantas descendientes. La F_2 derivada de la autofecundación de la F_1 no se distribuirá en sólo dos o tres clases discretas de altura en las proporciones 3:1 ó 1:2:1. En su lugar, la altura de las distintas plantas F_2 variará de forma continua desde un extremo parental al otro. Este comportamiento en los cruzamientos no es una excepción, sino la regla para la mayoría de los caracteres y en la mayoría de las especies. Mendel obtuvo sus sencillos resultados porque trabajó con variedades hortícolas de guisante de jardín que diferían unas de otras en diferencias alélicas simples de efectos fenotípicos drásticos. Si Mendel hubiera realizado sus experimentos sobre la variación natural de las malas hierbas del jardín, en lugar de utilizar variedades atípicas de guisantes, nunca hubiera descubierto sus leyes. En general, el tamaño, la forma, el color, la actividad fisiológica y la conducta no segregan de forma sencilla en los cruzamientos.

El hecho de que la mayoría de los caracteres fenotípicos cambien de forma continua no significa que su variación sea el resultado de algún mecanismo genético diferente al de los genes mendelianos que hemos venido estudiando. La continuidad del fenotipo es el resultado de dos fenómenos. En primer lugar, cada genotipo no tiene una expresión fenotípica única, sino una norma de reacción que cubre una amplia gama fenotípica (véase el Cap. 1). El resultado es que las diferencias fenotípicas entre las clases genotípicas se tornan difusas y somos incapaces de asignar de forma inequívoca un fenotipo particular a un genotipo concreto. En segundo lugar, puede haber muchos loci diferentes cuyos alelos en segregación contribuyan a las diferencias en el fenotipo observado. Suponga, por ejemplo, que cinco loci de importancia similar afectan al número de flores que desarrolla una



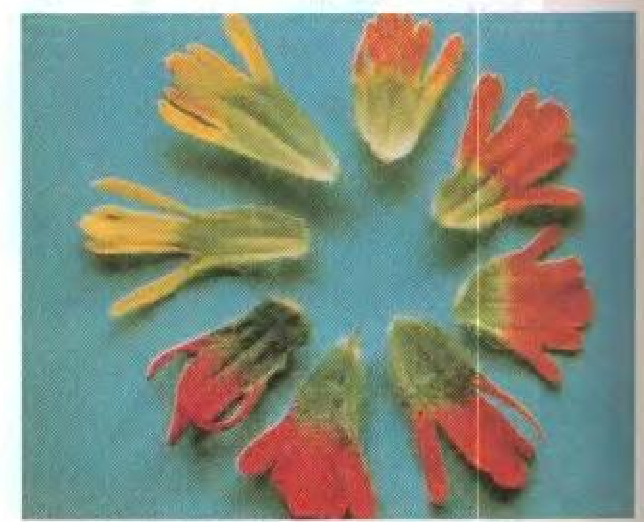


Figura 25-1. Herencia cuantitativa del color de las brácteas de la especie *Castilleja hispida*. La fotografía de la izquierda muestra los extremos del rango de colores y la de la derecha ejemplos de coloraciones intermedias.

planta anual y que cada locus tiene dos alelos (llámelos + y −). Por simplicidad, suponga también que no existe dominancia y que un alelo + añade una flor, mientras que un alelo − no añade ninguna. Por tanto, existen $3^5 = 243$ genotipos diferentes posibles [tres genotipos posibles (+/+, +/− y −/−) para cada uno de los cinco loci], que van desde



pero sólo hay 11 clases fenotípicas (10, 9, 8, ... 0) ya que muchos genotipos tendrán el mismo número de alelos + y −. Por ejemplo, aunque sólo hay un genotipo con 10 alelos + y, por tanto, con un valor fenotípico medio de 10, existen 51 genotipos diferentes con 5 alelos + y 5 alelos −; por ejemplo,



Así que muchos genotipos diferentes pueden originar un mismo fenotipo medio. Al mismo tiempo, a causa de la variación ambiental, dos individuos del mismo genotipo puede que no manifiesten el mismo fenotipo. Esta ausencia de correspondencia uno a uno entre genotipo y fenotipo oscurece el mecanismo mendeliano subyacente. Si no podemos estudiar el comportamiento de los factores mendelianos que controlan directamente tales rasgos, ¿qué podemos aprender entonces sobre su genética?

Mediante las técnicas experimentales actuales, los genetistas pueden responder a las siguientes preguntas acerca de la genética de un carácter que varía de forma continua en una población (por ejemplo, la estatura en una población humana). Estas cuestiones constituyen el objeto de estudio de la **Genética cuantitativa**, la Genética de los caracteres que varían de forma continua:

1. ¿Contribuye *en alguna medida* la diversidad genética a la variación observada en el carácter? ¿Hay alelos segregando en la población que producen algún efecto diferencial en el carácter, o toda la variación es simplemente el resultado de la diversidad ambiental y el ruido de desarrollo (Cap. 1)?
2. Si existe variación genética, ¿cuáles son las normas de reacción de los distintos genotipos?
3. ¿Qué importancia tiene la variación genética como origen de la diversidad fenotípica total? ¿Son tales las normas de reacción y las condiciones ambientales que casi toda la variación fenotípica es consecuencia de diferencias ambientales y de inestabilidades del desarrollo, o predomina el efecto de la variación genética?
4. ¿Hay variación en muchos loci relacionados con el carácter (o sólo en unos pocos)? ¿Cómo están distribuidos en el genoma?
5. ¿Cómo interaccionan entre sí los diferentes loci para influir en el carácter? ¿Hay dominancia o epistasia (interacción entre genes de diferentes loci)?
6. ¿Existe algún fenómeno de herencia extranuclear (por ejemplo, algún efecto materno)?

Al final, el propósito de contestar estas preguntas es el de ser capaces de predecir qué tipos de descendencia se producirán en los cruzamientos entre fenotipos distintos.

La precisión con la que pueden plantearse y contestarse estas cuestiones varía mucho. Por una parte, en los organismos experimentales es relativamente simple determinar si hay alguna influencia genética, pero se requieren experimentos extremadamente laboriosos para localizar los genes (incluso de forma aproximada). En los seres humanos, por otra parte, es extremadamente difícil resolver incluso la cuestión de la existencia de influencias genéticas en la mayoría de los rasgos, porque es casi imposible separar los efectos ambientales de los genéticos en un organismo que no puede ser manipulado experimentalmente. Como consecuencia de ello, sabemos relativamente mucho acerca de la genética del número de cerdas de *Drosophila*, pero prácticamente nada acerca de la genética de los rasgos humanos complejos; unos pocos (como el color de la piel) están claramente influidos por los genes, mientras que otros (como la lengua concreta que habla un individuo) claramente no lo están. El propósito de este capítulo es desarrollar los conceptos básicos estadísticos y genéticos necesarios para resolver estas cuestiones, y proporcionar algunos ejemplos de las aplicaciones de esos conceptos a caracteres particulares de especies concretas.

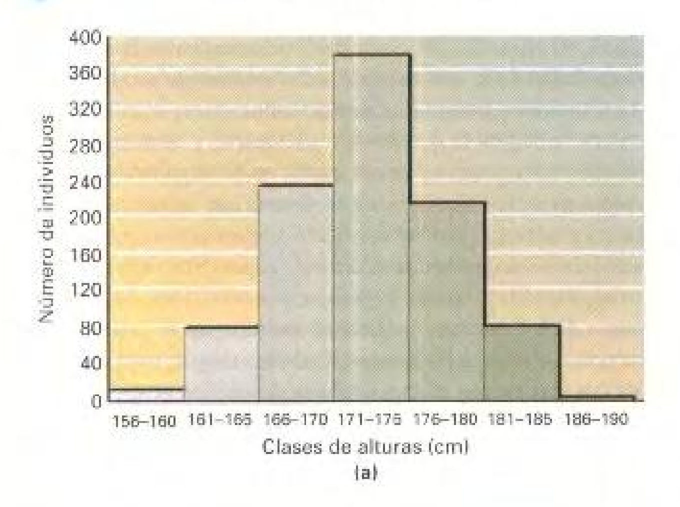
Algunas nociones estadísticas básicas

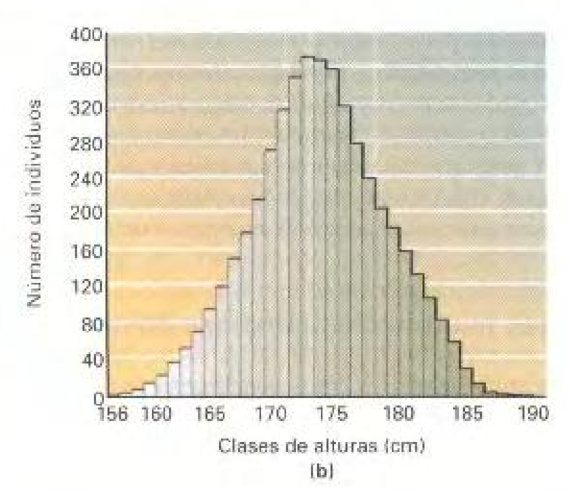
Para obtener respuestas a estas preguntas sobre los tipos más comunes de variación genética, hemos de examinar primero cierto número de herramientas estadísticas que son esenciales para el estudio de la Genética cuantitativa.

Distribuciones

El resultado del cruzamiento que implica a un carácter mendeliano puede describirse en términos de las proporciones de los descendientes, que se clasifican en varias clases fenotípicas distintas o, a menudo, simplemente en términos de la presencia o ausencia de una de esas clases. Por ejemplo, se esperaría que un cruzamiento entre una planta de flores rojas y otras de flores blancas diera como resultado plantas de flores rojas, o si se trata de un cruzamiento de prueba, que diera lugar a $\frac{1}{2}$ de plantas de flores rojas y $\frac{1}{2}$ de plantas de flores blancas. Sin embargo, se requiere un modo distinto de descripción para los caracteres cuantitativos. El concepto básico es el de **distribución estadística**. Si se talla a un gran número de estudiantes varones con una precisión de 5 centímetros (cm), aparecerán distintas medidas (digamos, entre 145 y 195 cm), pero caerán muchos más individuos en las categorías intermedias (digamos, entre 170 y 180 cm) que en las extremas.

Representando cada clase observada por una barra cuya altura sea proporcional al número de individuos de esa clase, el resultado sería una gráfica como la mostrada en la Figura 25-2*a*. Tal gráfica del número de individuos observados frente a las distintas clases de medidas es un **histograma de frecuencias**. Suponga ahora que se miden cinco veces más individuos, aproximando cada medida al centímetro más próximo. Las clases de





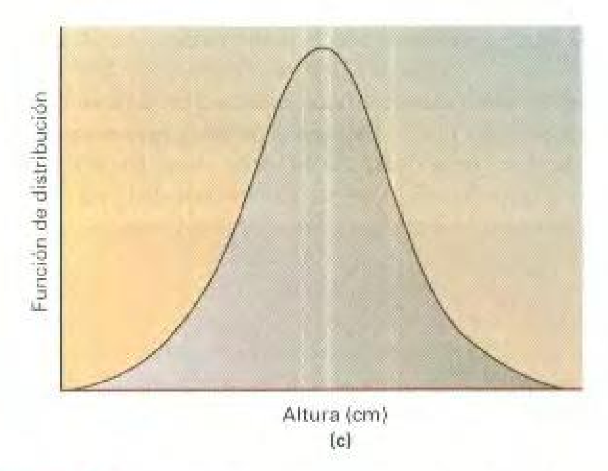


Figura 25-2. Distribución de frecuencias de alturas en los varones: (a) histograma con intervalos de clase de 5 cm; (b) histograma con intervalos de clase de 1 cm; (c) distribución límite continua.

la Figura 25-2*a* se subdividen ahora para producir un histograma como el mostrado en la Figura 25-2*b*. Si continuamos con este proceso, refinando la medida, pero incrementando proporcionalmente el número de individuos medidos, el histograma terminará por adoptar la apariencia continua de la Figura 25-2*c*, que es la **función de distribución** de las alturas en la población.

Esta curva continua es una idealización, ya que ninguna medida puede tomarse con una precisión infinita, ni a un número ilimitado de individuos. Además, la propia variable medida puede ser intrínsecamente discontinua, porque sea el recuento de algún número de objetos discretos, como las facetas oculares o las cerdas. Sin embargo, es conveniente a veces desarrollar conceptos empleando esta figura algo idealizada como simplificación válida del histograma de frecuencias realmente observadas, más complicado (Fig. 25-2*a*).

Medidas estadísticas

Aunque una distribución contiene toda la información sobre un conjunto de medidas, nos gustaría poder condensar esta información en unos pocos números característicos que lleven la información necesaria sobre la distribución sin tener que detallarla. Las características de una distribución que nos gustaría especificar son las siguientes:

1. Dónde se localiza la distribución a lo largo del intervalo de valores posibles ¿Están los valores observados próximos a 100 o próximos a 1000? Necesitamos, por tanto, una medida de la **tendencia media**.
2. Cuánta variación existe entre las medidas individuales. ¿Se concentran todas cerca de un valor central o varían a lo largo de un intervalo amplio? Es decir, necesitamos una medida de la **dispersión**.
3. Si estamos considerando más de una característica, ¿cómo se relacionan los valores de esos diferentes caracteres? ¿Existe alguna relación entre el tamaño del cuerpo y la fertilidad? ¿Es positiva o negativa? ¿Tienen los padres más altos descendientes más altos? Si es así, lo consideraríamos como prueba de que los genes influyen en el tamaño del cuerpo. Por tanto, necesitamos indicadores de **relación** entre medidas.

Entre las medidas más utilizadas de la tendencia media está la observación más frecuente, la **moda**, y la media aritmética de las observaciones, la **media**. La dispersión de una distribución se mide casi siempre por la **varianza**, que es la media del cuadrado de las diferencias entre las observaciones y la media. La relación entre diferentes variables se mide por la **correlación**, que es el producto medio de la desviación de una variable de su media por la desviación de la otra variable de su propia media.

En el Apéndice de Estadística de este capítulo se describen en detalle las medidas más comúnmente utilizadas de la tendencia media, la dispersión y la relación. Tal descripción detallada aparece en una sección distinta para no interrumpir el flujo lógico del desarrollo de la Genética cuantitativa. No debemos pensar, sin embargo, que el conocimiento de esos conceptos estadísticos es algo en absoluto secundario. Una comprensión adecuada de la Genética cuantitativa requiere el dominio de ese material.

Genotipos y distribución fenotípica

Mediante los conceptos de distribución, media y varianza, podemos entender la diferencia entre rasgos genéticos cuantitativos y

mendelianos. Supongamos que en una población de plantas hay tres genotipos, cada uno de los cuales ejerce cierto efecto diferencial sobre la tasa de crecimiento. Supongamos, además, que hay cierto grado de variación ambiental de una planta a otra, debido a la falta de homogeneidad del suelo sobre el que está creciendo la población, y a que hay algún ruido de desarrollo (véase el Cap. 1). Para cada genotipo habrá una distribución separada de fenotipos, con una media y una desviación típica que dependen del genotipo y del conjunto de condiciones ambientales. Supongamos que estas distribuciones se asemejan a las tres distribuciones de altura de la Figura 25-3*a*. Finalmente, supongamos que la población consta de una mezcla de los tres genotipos, pero en las proporciones desiguales 1:2:3 (*a/a* : *A/a* : *A/A*). En esas condiciones, la distribución fenotípica conjunta de los individuos de la población se parecerá a la línea negra de la Figura 25-3*b*, que resulta de sumar las tres distribuciones genotípicas aisladas subyacentes, ponderadas por sus frecuencias en la población. Esta ponderación por frecuencia se indica en la Figura 25-3*b* por las diferentes alturas de las distribuciones componentes cuya suma da lugar a la distribución total. La media de esta distribución total es el promedio de las tres medias genotípicas, ponderadas de nuevo por las frecuencias de los genotipos en la población. La varianza de la distribución total se debe en parte a la variación ambiental que afecta a cada genotipo y en parte a los valores ligeramente distintos de las medias de los tres genotipos.

Merecen destacarse dos aspectos de la distribución total. En primer lugar, hay una moda única. A pesar de la existencia de tres distribuciones genotípicas separadas subyacentes, la distribución total de la población no exhibe varias modas. En segundo lugar, cualquier individuo cuya altura caiga entre las dos flechas podría proceder de cualquiera de los tres genotipos, porque se solapan bastante. El resultado es que no podemos llevar a cabo ningún análisis mendeliano sencillo para determinar el genotipo de ningún organismo individual. Supongamos, por ejemplo, que los tres genotipos son los dos homocigotos y el heterocigoto de una pareja alélica de cierto locus, donde *a/a* es el homocigoto bajo, *A/A* el alto, y el heterocigoto posee una altura intermedia. Como las distribuciones fenotípicas se solapan tanto, no podemos saber el genotipo de un individuo determinado. A la inversa, si cruzamos un homocigoto *a/a* y un heterocigoto *A/a*, la descendencia no caerá en dos clases discretas, en proporción 1:1, sino que cubrirá uniformemente casi todo el intervalo de fenotipos. De modo que no podemos saber si el cruzamiento es, de hecho, *a/a* × *A/a*, y no *a/a* × *A/A* o *A/a* × *A/a*.

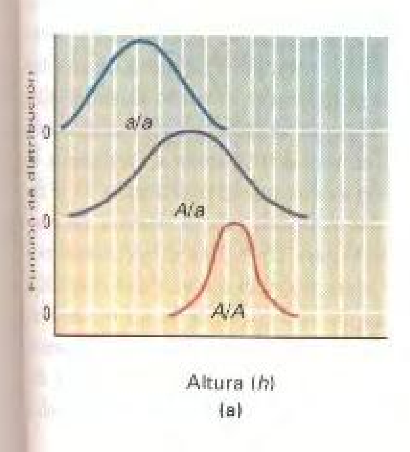
Supongamos que cultivamos las plantas hipotéticas de la Figura 25-3 en un ambiente que acentúa las diferencias entre los genotipos, por ejemplo, doblando la tasa de crecimiento de todos los genotipos. Al mismo tiempo, tenemos mucho cuidado en proporcionar exactamente el mismo ambiente a todas las plantas. Entonces, la varianza fenotípica de cada genotipo particular se reduce, porque todas las plantas han crecido en las mismas condiciones; simultáneamente, las diferencias entre los genotipos se hacen mayores a causa de la mayor rapidez de crecimiento. El resultado (Fig. 25-4*b*) sería la separación del conjunto de la población en tres distribuciones fenotípicas no solapadas, cada una característica de un genotipo. Ahora sí podríamos llevar a cabo un análisis mendeliano convencional de la altura de la planta. Un carácter «cuantitativo» se ha convertido en «cualitativo». Esta conversión ha sido posible logrando que las diferencias entre las medidas de los distintos genotipos se hagan grandes en comparación con la variación entre individuos de un mismo genotipo.

COROLARIO

Un carácter cuantitativo es aquel para el cual las diferencias fenotípicas medias entre distintos genotipos son pequeñas comparadas con la variación entre individuos de un mismo genotipo.

En ocasiones, se supone que la variación continua de un carácter se debe necesariamente a un gran número de genes en segregación, de modo que la variación continua se considera como prueba del control de ese carácter por muchos genes. Pero, como acabamos de mostrar, eso no es necesariamente cierto. Si la diferencia entre las medidas genotípicas es pequeña comparada con la varianza ambiental, entonces incluso un caso sencillo de un gen con dos alelos puede generar una variación fenotípica continua.

Si el rango de variación de un carácter es limitado y hay muchos loci segregando que influyen sobre él, se espera, por supuesto, que el carácter muestre variación continua, porque cada sustitución alélica debe ser responsable de sólo una pequeña diferencia en el rasgo. Esta **hipótesis de los factores múltiples** (que gran número de genes, cada uno con un pequeño efecto, están segregando para generar variación cuantitativa) ha sido



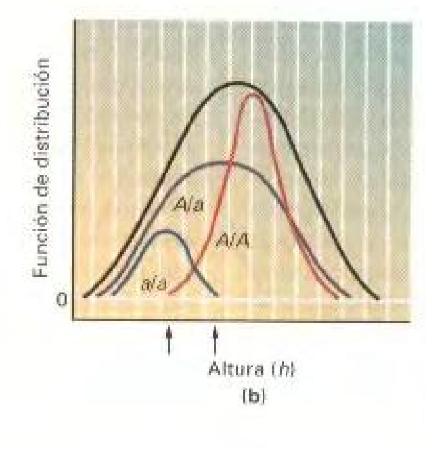
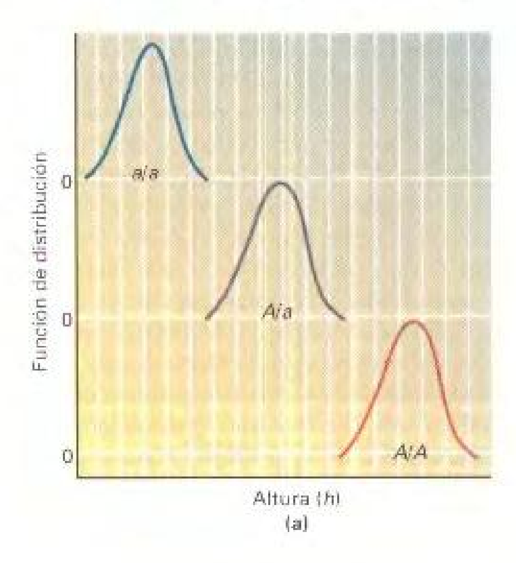


Figura 25-3. (a) Distribuciones fenotípicas de tres genotipos. (b) Distribución fenotípica de una población que resulta de la combinación de los tres genotipos en la proporción 1:2:3 (*a/a* : *A/a* : *A/A*).



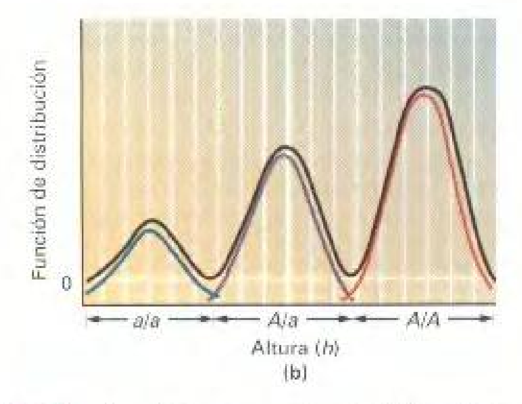


Figura 25-4. Cuando los mismos genotipos de la Figura 25-3 se cultivan en ambientes hostiles cuidadosamente controlados, el resultado es una variación fenotípica menor en cada genotipo y una mayor diferencia entre los genotipos. Las alturas de las distribuciones individuales de la parte b son proporcionales a las frecuencias de los genotipos en la mezcla.

desde hace tiempo el modelo básico de la Genética cuantitativa, aunque no hay pruebas convincentes de que tales grupos de genes existan realmente. Para estos hipotéticos factores de efectos pequeños, pero iguales, se acuñó un nombre especial, **poligenes**, en oposición a los genes del análisis mendeliano simple.

Sin embargo, es importante recordar que el *número* de loci segregantes que influyen en un rasgo no es lo que distingue a los caracteres cuantitativos de los cualitativos. Incluso en ausencia de una variación ambiental grande, tan sólo se requiere la variación genética de unos pocos loci para producir una variación indistinguible del efecto de muchos loci de pequeño efecto. Como ejemplo, consideremos uno de los primeros experimentos de la Genética cuantitativa, el de Wilhelm Johannsen sobre líneas puras. Por **endogamia** (cruzamientos entre parientes próximos), Johannsen produjo 19 líneas homocigóticas de plantas de judías a partir de una población original genéticamente heterogénea. Cada línea mostraba un peso medio de semilla característico, que iba desde 0.64 g por semilla para la línea de mayor peso, hasta 0.35 g para la de menor peso. No está claro en absoluto que todas esas líneas fueran genéticamente diferentes (por ejemplo, en cinco de las líneas los pesos de las semillas fueron 0.450 g, 0.453 g, 0.454 g y 0.455 g), pero adoptemos la posición más extrema: que todas las líneas *eran* diferentes. Obviamente, estas observaciones serían incompatibles con un modelo de acción génica simple «un locus-dos alelos». En este caso, si en la población original hubiera dos alelos segregando, *A* y *a*, todas las líneas endogámicas derivadas de esa población caerían en una de dos clases: *A*/*A* o *a*/*a*. Si, por el contrario, hubiera, digamos, 100 loci, cada uno de pequeño efecto, segregando en la población original, podría producirse un número enorme de líneas endogámicas diferentes, cada una con una combinación distinta de homocigotos en distintos loci.

Sin embargo, no es necesario un número tan grande de loci para obtener el resultado observado por Johannsen. Si hubiera habido sólo cinco loci, cada uno con tres alelos, entonces podrían haberse producido por endogamia $3^5 = 243$ clases diferentes de homocigotos. Tomando al azar 19 líneas endogámicas, hay una probabilidad alta (cerca del 50 %) de que cada una de las 19 líneas pertenezca a una distinta de las 243 clases posibles. Por tanto, los resultados experimentales de Johannsen se explican fácilmente con un número relativamente pequeño de genes. De modo que no hay una línea divisoria real entre los rasgos poligénicos y otros rasgos. Puede afirmarse que ningún rasgo de nivel superior al de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido está influido por un solo gen. Además, los rasgos influidos por muchos genes no lo están en igual medida por todos ellos. Algunos genes tendrán efectos grandes sobre el rasgo, y otros, efectos menores.

COROLARIO

La diferencia crítica entre los rasgos mendelianos y los cuantitativos no es el número de loci en segregación, sino la magnitud de las diferencias fenotípicas entre genotipos en comparación con la variación individual dentro de cada clase genotípica.

Norma de reacción y distribución fenotípica

Como hemos visto, la distribución fenotípica de un rasgo es una función de las diferencias medias entre genotipos y de la variación entre individuos genotípicamente idénticos. Pero esos dos valores son a su vez funciones de la secuencia de condiciones ambientales en las que los organismos se desarrollan y viven. Para un genotipo dado, en cada ambiente aparecerá un fenotipo determinado (ignorando por el momento el ruido de desarrollo). En consecuencia, una *distribución de condiciones ambientales* se reflejará biológicamente en una *distribución de fenotipos*. La manera en que la distribución ambiental se transforma en la distribución fenotípica viene determinada por **la norma de reacción**, como se muestra en la Figura 25-5. El eje horizontal es el ambiente (temperatura, por ejemplo) y el eje vertical el fenotipo (altura de la planta, por ejemplo). La curva de la norma de reacción para los genotipos muestra cómo cada temperatura particular produce una altura de planta determinada. Así, la línea discontinua que parte del punto de 18 °C del eje correspondiente a

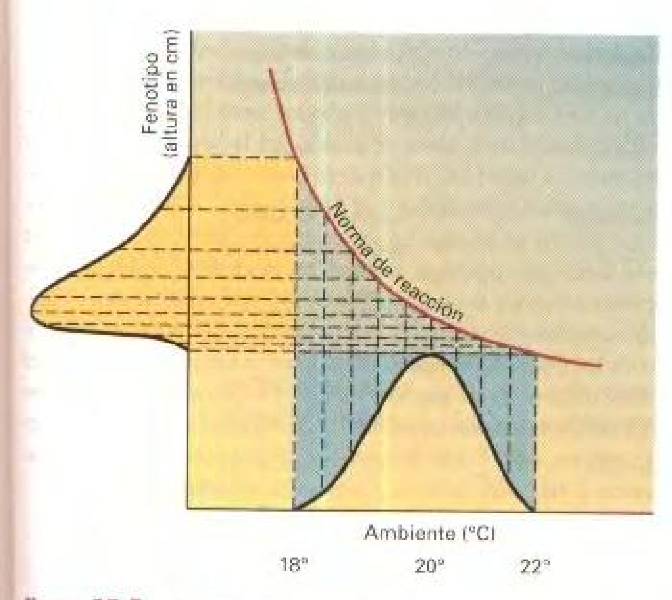


Figura 25-5. La norma de reacción de un genotipo convierte la distribución de condiciones ambientales del eje horizontal en la distribución de fenotipos del eje vertical.

la temperatura se refleja en la curva de la norma de reacción dando la altura de la planta correspondiente sobre el eje vertical del fenotipo, y así sucesivamente para cada temperatura. Si un gran número de individuos se desarrollan, por ejemplo, a 20 °C, entonces un gran número de individuos tendrá el fenotipo que corresponde a 20 °C, como se señala por la línea discontinua; y si sólo un número pequeño se desarrolla a 18 °C, serán pocas las plantas que tengan la altura correspondiente. Por tanto, la distribución de frecuencias de condiciones ambientales de desarrollo se reflejará en una distribución de frecuencias de fenotipos determinada por la forma de la curva de la norma de reacción. Es como si un observador, situado en el eje vertical del fenotipo, estuviese viendo la distribución ambiental, no directamente, sino reflejada en el espejo curvado de la norma de reacción. La forma de la curvatura determinará cómo la distribución de las condiciones ambientales se distorsiona sobre el eje del fenotipo. Así, la norma de reacción de la Figura 25-5 cae muy rápidamente a bajas temperaturas (el fenotipo cambia rápidamente con pequeños cambios de temperatura), pero se aplana a temperaturas altas, de modo que a estas temperaturas la altura de las plantas es mucho menos sensible a diferencias de temperatura. El resultado es que la distribución ambiental simétrica se convierte en una distribución fenotípica asimétrica con una cola larga en las alturas mayores, que corresponden a las temperaturas más bajas.

Siguiendo el mismo tipo de análisis, la Figura 25-6 muestra cómo una población compuesta de dos genotipos con diferentes normas de reacción tiene una distribución fenotípica que depende de la distribución de ambientes. Si éstos se reparten como muestra la curva de distribución negra, la población resultante tendrá entonces una distribución unimodal, ya que la diferencia entre genotipos es muy pequeña en ese rango de ambientes, comparada con la sensibilidad de las normas de reacción a pequeños cambios de temperatura. Sin embargo, si la distribución de ambientes se desplaza hacia la derecha, como muestra la curva de distribución gris, se producirá una distribución de fenotipos bimodal, ya que las normas de reacción son casi planas en ese rango de ambientes, pero muy distintas una de otra.

COROLARIO

Una distribución de ambientes se refleja biológicamente en una distribución de fenotipos. La transformación de la distribución ambiental en una distribución fenotípica viene determinada por la norma de reacción.

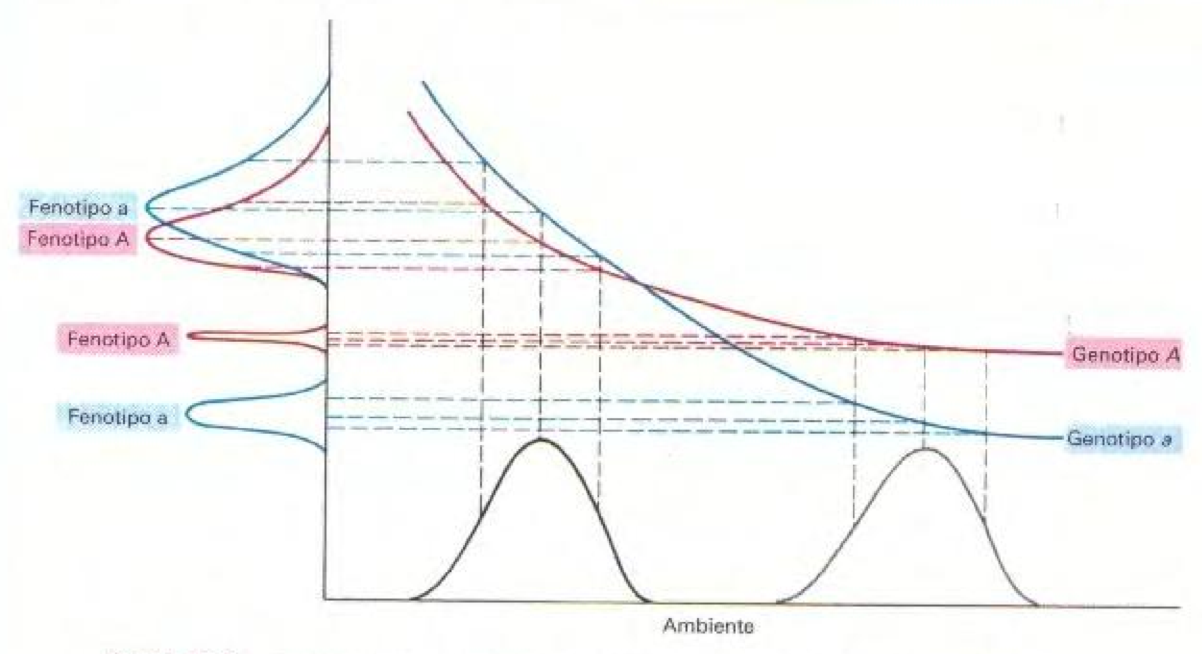


Figura 25-6. Dos distribuciones ambientales distintas dan lugar a dos distribuciones fenotípicas diferentes de dos genotipos.

Determinación de la norma de reacción

Sorprendentemente, se sabe muy poco acerca de la norma de reacción de cualquier rasgo cuantitativo en cualquier especie, en parte porque en la mayoría de las especies de reproducción sexual resulta muy difícil reproducir un mismo genotipo para poder estudiarlo en ambientes distintos. Por esta razón no conocemos, por ejemplo, la norma de reacción de ningún genotipo para ningún rasgo cuantitativo humano.

En plantas y animales domesticados

Unos pocos estudios de normas de reacción se han realizado en plantas, que pueden ser propagadas clonalmente. Los resultados de uno de esos estudios se presentaron en el Capítulo 1. En organismos de reproducción sexual, es posible replicar genotipos mediante la estrategia de cruzar entre sí parientes próximos, en cruzamientos consanguíneos. Mediante autofecundación (si es posible) o mediante cruzamientos hermano-hermana, repetidos una generación tras otra, puede convertirse una **línea segregante** (que contiene tanto homocigotos como heterocigotos para un locus) en una línea homocigótica.

El propósito de crear líneas homocigóticas es generar grupos de organismos en los cuales todos los individuos sean genéticamente idénticos. Se deja entonces que estas líneas homocigóticas se desarrollen en diferentes ambientes para establecer una norma de reacción. Alternativamente, pueden cruzarse dos líneas homocigóticas diferentes y caracterizar a los descendientes F_1, genéticamente idénticos unos a otros, en los distintos ambientes.

Para el estudio ideal de una norma de reacción, todos los individuos deberían ser idénticos genéticamente, pero el proceso de cruzamientos consanguíneos aumenta la homocigosis del grupo lentamente, generación tras generación, dependiendo de la proximidad de los parientes que se cruzan. En el maíz, por ejemplo, se escoge un único individuo y se autopoliniza. A continuación, en la generación siguiente, se escoge y autopoliniza uno solo de sus descendientes. En la tercera generación, se escoge y autopoliniza uno solo de los descendientes, y así sucesivamente. Supongamos que el individuo original era ya en la primera generación homocigótico en algún locus. En ese caso, toda la descendencia de su autopolinización también será homocigótica e idéntica en ese locus. En las futuras generaciones obtenidas por autopolinización, simplemente se preservará la homocigosis. Si, por otra parte, el individuo original era heterocigótico, la autofecundación $A/a \times A/a$ producirá $\frac{1}{4}$ de homocigotos A/A y $\frac{1}{4}$ de homocigotos a/a. Si se escoge un descendiente único en la siguiente generación para propagar la línea, habrá un 50 % de probabilidades de que ahora sea homocigótico. Si, por mala suerte, el individuo elegido fuera todavía heterocigótico, hay otra vez una probabilidad del 50 % de que el elegido en la tercera generación sea homocigótico, y así sucesivamente. Entonces, después de una generación de autofecundación, del conjunto inicial de loci heterocigóticos, sólo $\frac{1}{2}$ será todavía heterocigótico; tras dos generaciones, $\frac{1}{4}$; tras tres, $\frac{1}{8}$. En la generación n-ésima:

$$\text{Het}n = \frac{1}{2^n}\,\text{Het}_0$$

donde Het_n es la proporción de loci heterocigóticos en la generación n-ésima y Het_0 la proporción en la generación 0. Cuando la autofecundación no es posible, los cruzamientos hermano-hermana permiten alcanzar el mismo objetivo, aunque más lentamente. El Cuadro 25-1 compara la magnitud de la heterocigosis remanente tras n generaciones de autofecundación o de cruzamientos entre hermanos.

CUADRO 25-1. Heterocigosis remanente tras varias generaciones de cruzamientos de dos grados distintos de consanguinidad

	HETEROCIGOSIS REMANENTE	
Generación	Autofecundación	Cruzamientos entre hermanos
0	1.000	1.000
1	0.500	0.750
2	0.250	0.625
3	0.125	0.500
4	0.0625	0.406
5	0.03125	0.338
10	0.000977	0.114
20	1.05×10^{-6}	0.014
n	$\text{Het}_n = \frac{1}{2}\text{Het}_{n-1}$	$\text{Het}_n = \frac{1}{2}\text{Het}_{n-1} + \frac{1}{4}\text{Het}_{n-2}$

En poblaciones naturales

Para estudiar la norma de reacción de una población natural, se escoge un número grande de líneas de la población y se llevan a cabo cruzamientos consanguíneos durante un número de generaciones suficiente para garantizar que cada línea es virtualmente homocigótica para todos los loci. Para cada locus, cada línea será homocigótica para un alelo tomado al azar de los presentes en la población original. Las propias líneas consanguíneas no pueden emplearse para caracterizar las normas de reacción de la población natural, ya que tales genotipos completamente homocigóticos no existían en dicha población. Cada línea consanguínea se cruza con cada una de las otras para generar heterocigotos que reconstituyen la población original, y se toma un número arbitrario de individuos de cada cruzamiento. Si la constitución genética de la línea consanguínea 1 es $A/A \cdot B/B \cdot c/c \cdot d/d \cdot E/E$ ..., y la de línea consanguínea 2 es $a/a \cdot B/B \cdot C/C \cdot d/d \cdot e/e$ ..., un cruzamiento entre ellas producirá un gran número de descendientes que serán todos $A/a \cdot B/B \cdot C/c \cdot d/d \cdot E/e$ ... y que pueden criarse en distintos ambientes.

La consanguinidad mediante cruzamientos repetidos entre parientes próximos produce homocigosis completa de todo el genoma. En especies como *Drosophila*, en la que se dispone de los necesarios marcadores dominantes y supresores de recombinación, es posible generar líneas que son homocigóticas para un solo cromosoma, en vez de la dotación cromosómica completa, como se muestra en la Figura 25-7 para el caso de un autosoma. Un único macho de la población a estudiar se cruza con una hembra portadora de un cromosoma que incluye un supresor de recombinación C (generalmente, una inversión compleja), un alelo letal recesivo l, y un marcador dominante visible M_1 en

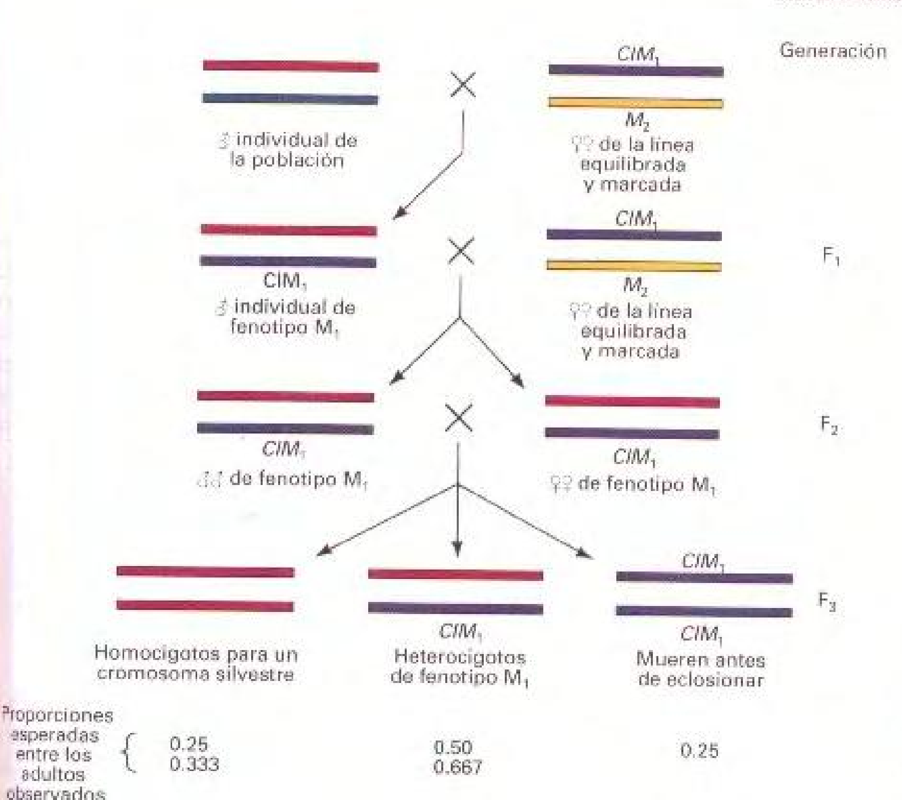


Figura 25-7. Método para llevar autosomas a homocigosis mediante la utilización de dos genes marcadores dominantes, M_1 y M_2, un supresor de entrecruzamientos, *C*, y un gen letal, *l*.

heterocigosis con un segundo marcador dominante visible M_2. Obtenida la F_1, se escoge un *único* macho portador del cromosoma ClM_1. Este macho, que lleva también un cromosoma silvestre de la población natural, se cruza de nuevo con la cepa marcadora de laboratorio. En la F_2, todas las moscas de fenotipo M_1 son necesariamente heterocigóticas para el cromosoma silvestre de la población original, ya que la condición ClM_1/ClM_1 es letal, y se ha impedido la recombinación. En la F_3, todas las moscas silvestres son igualmente homocigóticas para el cromosoma silvestre y puede disponerse de ellas para generar una línea con la que estudiar la norma de reacción. (En el Cap. 15 se presenta otra aplicación de esta técnica).

Resultados de los estudios de la norma de reacción

Se han realizado muy pocos estudios de la norma de reacción para caracteres cuantitativos de poblaciones naturales, habiéndose realizado bastantes más en especies domesticadas como el maíz, que puede autofecundarse, o las fresas, que pueden propagarse de forma clonal. Los resultados de tales estudios se parecen a los de la Figura 25-8, que muestra las normas de reacción del número de cerdas abdominales en función de la temperatura en homocigotos del segundo cromosoma de *D. pseudoobscura*. Ningún genotipo está consistentemente por encima o por debajo de los demás. En su lugar, existen pequeñas diferencias entre genotipos, y la dirección de estas diferencias a lo largo de un rango amplio de ambientes no es consistente.

Estos hechos tienen dos consecuencias importantes. En primer lugar, la selección de fenotipos «superiores» en animales

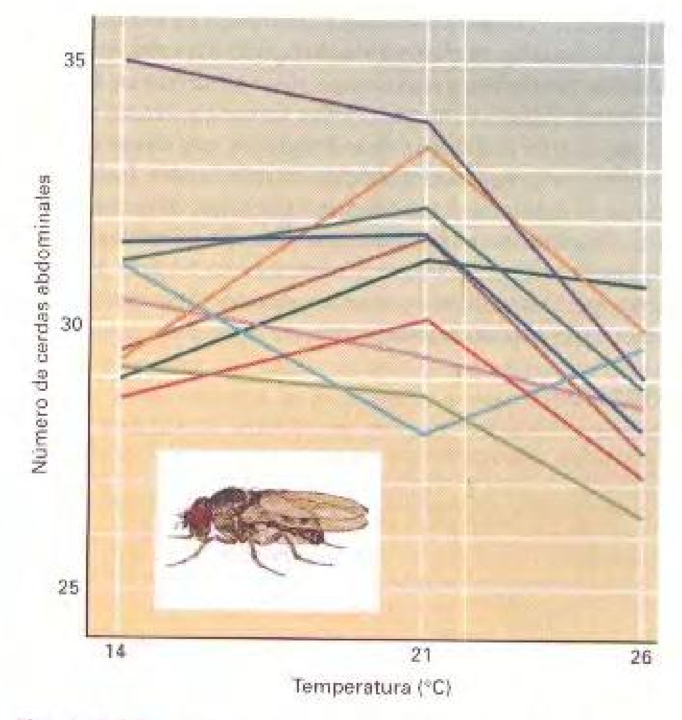


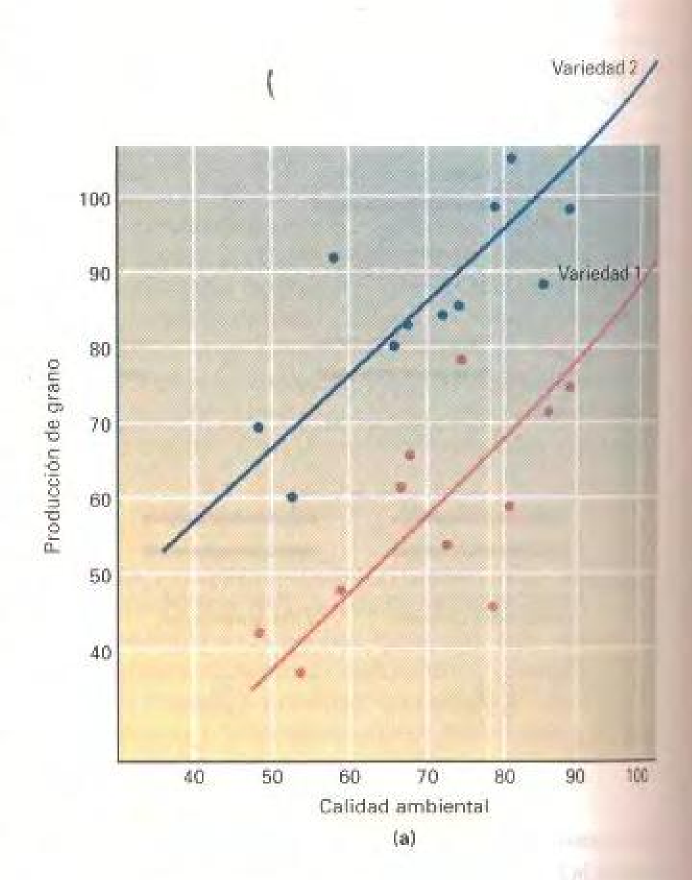
Figura 25-8. Número de cerdas abdominales debidas a diferentes genotipos homocigóticos de *Drosophila pseudoobscura*, a tres temperaturas diferentes. (Datos por cortesía de A. P. Gupta.) (Imagen: Placa IV, Publicación 4313 de la Universidad de Texas, *Studies in the Genetics of Drosophila III, The Drosophilidae of the Southwest*, por J. T. Patterson. Cortesía de Life Sciences Library, Universidad de Texas, Austin.)

domesticados y plantas cultivadas dará como resultado variedades con adaptaciones muy especiales, que podrían no mostrar sus cualidades superiores en otros ambientes. Este problema puede evitarse en alguna medida comprobando deliberadamente los genotipos en un rango de ambientes (por ejemplo, durante varios años y en varias localidades). Sería incluso mejor, sin embargo, si los mejoradores de plantas pudieran analizar sus variedades seleccionadas en una diversidad de ambientes controlados, en los que pudieran manipularse por separado diferentes factores ambientales. Las consecuencias de la mejora real de plantas pueden comprobarse en la Figura 25-9, en la que se muestran las cosechas obtenidas de dos variedades de maíz en función de diferentes ambientes agrícolas. La variedad 1 es una variedad más antigua de maíz híbrido; la variedad 2 es un híbrido posterior «mejorado». Se compara el rendimiento en cultivos de baja densidad, que prevalecían cuando se obtuvo la variedad 1, y en cultivos de alta densidad, característicos de la agricultura de la época en la que se obtuvo la variedad 2. A densidad alta, la variedad nueva es claramente superior a la variedad antigua en todos los ambientes (Fig. 25-9*a*). A densidad baja, sin embargo, la situación es muy diferente. En primer lugar, observe que la nueva variedad es menos sensible al ambiente que el híbrido antiguo, como muestra su norma de reacción más plana. En segundo lugar, la nueva variedad «mejorada» es, de hecho, peor en condiciones agrícolas óptimas. En tercer lugar, la mejora en el rendimiento de la cosecha de la variedad nueva no se observa en cultivos crecidos a densidad baja, característica de la práctica agrícola inicial.

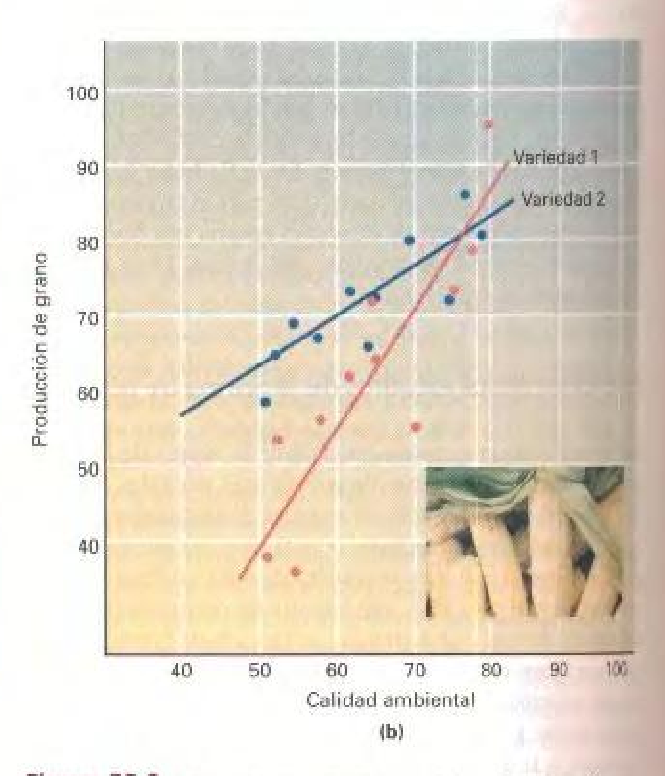
La segunda consecuencia de la naturaleza de las normas de reacción es que, incluso si resultara que existe variación genética para ciertos rasgos mentales y emocionales de la especie humana, lo cual no está claro en absoluto, sería improbable que esa variación favoreciera a un genotipo sobre los demás en diversos ambientes. Hemos de ser precavidos contra hipotéticas normas de reacción de rasgos humanos cognitivos que muestren a un genotipo como incondicionalmente superior a otro. Incluso dejando a un lado todas las cuestiones sobre juicios morales y políticos, simplemente no hay base para describir diferentes genotipos humanos como «mejores» o «peores» en ninguna escala, a menos que el investigador sea capaz de especificar muy exactamente las condiciones ambientales.

COROLARIO

Los estudios sobre la norma de reacción demuestran sólo pequeñas diferencias entre genotipos naturales, y tales diferencias no son consistentes en una amplia diversidad de ambientes. Así, genotipos «superiores» de animales domesticados y plantas cultivadas pueden resultar superiores sólo en ciertos ambientes. Si resultara que los seres humanos presentaran variación genética para varios rasgos mentales y emocionales, sería improbable que esa variación favoreciera a un genotipo sobre otros en diversos ambientes.



(a)



(b)

Figura 25-9. Cosechas de grano de dos variedades de maíz en diferentes ambientes: (a) alta densidad de siembra; (b) baja densidad de siembra. (Datos, cortesía de W. A. Russell, *Proceedings of the 29th Annual Corn and Sorghum Research Conference*, 1974). (Fotografía © Bonnie Sue/Photo Researchers)

La heredabilidad de un carácter

La cuestión más básica que podemos plantearnos sobre un rasgo cuantitativo es si los genes influyen en alguna medida en la va-

riación observada en el carácter. Es importante entender que eso no es lo mismo que preguntarnos si los genes desempeñan o no algún papel en el desarrollo del carácter. Los procesos de desarrollo mediados por genes constituyen la base de todos los caracteres, pero la *variación* de unos individuos a otros no es necesariamente el resultado de *variación genética*. Así, la posibilidad de hablar cualquier lengua depende de forma crítica de las estructuras del sistema nervioso central, así como de las cuerdas vocales, la lengua, los labios y los oídos, que dependen a su vez de la naturaleza del genoma humano. No hay ningún ambiente en el que las vacas puedan hablar. Pero aunque la lengua particular que hablan los seres humanos varía de nación a nación, tal variación no es, en absoluto, genética.

COROLARIO

La pregunta de si un rasgo es o no hereditario es una pregunta sobre el papel que desempeñan las diferencias en los genes en las diferencias fenotípicas entre individuos o grupos.

Heredabilidad e incidencia familiar

En principio, es fácil determinar si, para un rasgo particular, existe variación genética que influye en la variación fenotípica entre individuos. Si hay genes implicados, los individuos emparentados biológicamente deberían (en promedio) parecerse más unos a otros que los individuos no emparentados. Este parecido se reflejaría en una correlación positiva, bien entre progenitores y descendientes o bien entre hermanos (descendientes de los mismos progenitores). Los progenitores de mayor tamaño que la media tendrían descendientes de mayor tamaño que la media; cuantas más semillas produzca una planta, más semillas producirán sus descendientes. Tales correlaciones entre parientes, sin embargo, indican variación genética sólo si los parientes no comparten un ambiente común *en mayor medida que los individuos no emparentados*. Es fundamental distinguir entre *incidencia familiar* y *heredabilidad*. Los rasgos son **familiares** si, por cualquier razón, son compartidos por los miembros de una misma familia. Los rasgos son **heredables** sólo si la semejanza nace de compartir genotipos.

Existen dos métodos generales para establecer la heredabilidad de un carácter y distinguirla de su incidencia familiar. El primero depende de la *semejanza fenotípica* entre parientes. Durante la mayor parte de la historia de la Genética, este método ha sido el único posible; así que casi toda la evidencia existente sobre la heredabilidad de la mayoría de los caracteres en organismos experimentales y seres humanos se ha establecido mediante esta aproximación. El segundo método, que utiliza la *segregación de genes marcadores*, consiste en la demostración de que los genotipos que llevan alelos diferentes de genes marcadores también difieren en su fenotipo medio para el carácter cuantitativo. Si los genes marcadores (que no tienen nada que ver con el carácter en estudio) varían en relación con el carácter, presumiblemente están ligados a genes que *sí* influyen sobre el carácter y su variación. Así se demuestra la heredabilidad incluso sin conocer los verdaderos genes que causan la variación. Este método requiere que el genoma del organismo en estudio posea un gran número de loci marcadores variables, esparcidos por todo el genoma, que sean detectables genéticamente. Tales loci marcadores pueden estudiarse mediante análisis electroforéticos de variación de proteínas o, en vertebrados, a partir de estudios inmunológicos de genes de grupos sanguíneos. Por ejemplo, dentro de las gallinas, aquellas con grupos sanguíneos diferentes muestran ciertas diferencias en el peso de los huevos.

Desde la introducción de métodos moleculares para el estudio de la variación en las secuencias del DNA, se ha descubierto un enorme número de posiciones nucleotídicas variables en una gran diversidad de organismos. Esta variación molecular incluye tanto sustituciones de un nucleótido como inserciones y deleciones de secuencias de nucleótidos más largas. Tales variaciones se detectan normalmente por la ganancia o pérdida de sitios de corte de enzimas de restricción, o por la variación en la longitud de las secuencias de DNA entre dos sitios de restricción fijos. Ambos tipos de variaciones son una forma de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*). En los tomates, por ejemplo, estirpes que contienen distintas variantes de RFLP difieren en las características de los frutos.

No obstante, ya que bastante de cuanto se conoce acerca de la heredabilidad, especialmente en Genética humana, depende todavía de la semejanza fenotípica entre parientes, comenzaremos el examen del problema de la heredabilidad analizando la semejanza fenotípica.

Semejanza fenotípica entre parientes

En organismos experimentales, no existe ningún problema para separar las semejanzas ambientales de las genéticas. Los descendientes de una vaca que produce mucha leche y los de una que produce poca leche pueden criarse juntos en el mismo ambiente y comprobar si, a pesar de la semejanza ambiental, cada uno se parece a sus propios progenitores. Esto es difícil de hacer en las poblaciones naturales, especialmente en las humanas. Debido a la naturaleza de las sociedades humanas, los miembros de una misma familia no sólo comparten genes, sino también ambientes similares. Así, la observación simple de que hay incidencia familiar de un rasgo no es interpretable genéticamente. En general, las personas que hablan húngaro tienen padres que hablan húngaro y las personas que hablan japonés tienen padres que hablan japonés. Y, sin embargo, la experiencia masiva de la inmigración en Norteamérica ha demostrado que estas diferencias lingüísticas, aunque familiares, no son genéticas. En los Estados Unidos, los rasgos sociales que presentan correlaciones más altas entre progenitores y descendientes son el partido político y la secta religiosa, pero tales rasgos no son hereditarios. La distinción entre incidencia familiar y herencia no es siempre tan obvia. La Comisión de Salud Pública que estudió originalmente la pelagra (una enfermedad debida a una deficiencia vitamínica) en el sur de Estados Unidos, en 1910, llegó a la conclusión de que era genética porque se presentaba por familias.

En poblaciones humanas, para determinar si un rasgo es hereditario debemos recurrir a estudios de adopción, evitando así la similitud ambiental habitual entre parientes biológicos. Los sujetos experimentales ideales son los gemelos idénticos criados por separado, porque son genéticamente idénticos pero viven en

ambientes distintos. Tales estudios de adopción deben estar concebidos de modo que no haya correlación entre el ambiente social de la familia adoptiva y el de la familia biológica. Este requisito es muy difícil de satisfacer, de modo que en la práctica sabemos muy poco sobre si los rasgos cuantitativos humanos de incidencia familiar son también heredables. El color de la piel es claramente heredable, como lo es la talla de los adultos, pero incluso con estos rasgos debemos ser muy cuidadosos. Sabemos que los genes afectan al color de la piel gracias a estudios de adopciones interraciales y a observaciones como la de que los descendientes de los esclavos africanos negros eran negros incluso cuando habían nacido y se habían criado en Canadá. ¿Pero afectan los genes a las diferencias entre las tallas de japoneses y europeos? Los hijos de los inmigrantes japoneses que nacieron y se criaron en Norteamérica son más altos que sus progenitores, pero más bajos de lo normal en Norteamérica, así que podemos concluir que algo influyen las diferencias genéticas. Sin embargo, la segunda generación de norteamericanos japoneses es incluso más alta que sus progenitores nacidos en Norteamérica. Parece que alguna influencia ambiental, o quizás un efecto materno, se hace sentir todavía en la primera generación de nacidos en Norteamérica. No podemos decir aún si hay diferencias genéticas para la talla que distingan a los norteamericanos de ascendencia, digamos, japonesa o sueca.

En las poblaciones humanas, rasgos de la personalidad como el temperamento, el rendimiento intelectual (incluidas las puntuaciones del coeficiente de inteligencia, CI), y toda una variedad de comportamientos, como el alcoholismo, y desórdenes mentales, como la esquizofrenia, han sido objetos de estudio de heredabilidad. Muchos muestran incidencia familiar. En efecto, hay una correlación positiva entre los valores del CI de los padres y los de sus hijos (la correlación es cercana al 0,5 en familias de americanos blancos), pero la correlación no distingue entre incidencia familiar y heredabilidad. Para conseguir esta distinción es necesario romper la correlación ambiental entre padres e hijos, por lo que son comunes los estudios de adopción. Como es difícil hacer aleatorio el ambiente, incluso en los casos de adopción, los indicios de heredabilidad de caracteres relativos a la personalidad humana y su comportamiento siguen siendo ambiguos, a pesar del gran número de estudios existentes. Los prejuicios sobre las causas de las diferencias humanas son profundos y están muy extendidos, y como resultado, los criterios de prueba aplicados a los estudios de heredabilidad del CI, por ejemplo, han sido mucho más laxos que los aplicados a los estudios sobre la producción de leche en las vacas.

La Figura 25-10 resume el método habitual de investigar la heredabilidad en los organismos experimentales. Se aparean individuos tomados de los extremos de la distribución con otros de su misma clase, y los descendientes se crían en un ambiente controlado común. Si hay una diferencia entre las medias de los dos grupos de descendientes, el rasgo es heredable. Por ejemplo, la mayoría de los rasgos morfológicos de *Drosophila* han resultado ser heredables, pero no todos ellos. Si se cruzan moscas con el ala derecha ligeramente más larga que el ala izquierda, sus descendientes no muestran una tendencia a pertenecer al «ala derechista» en mayor medida que los descendientes de moscas del «ala izquierdista». Como veremos más adelante, este método también puede utilizarse para obtener información cuantitativa sobre la heredabilidad.

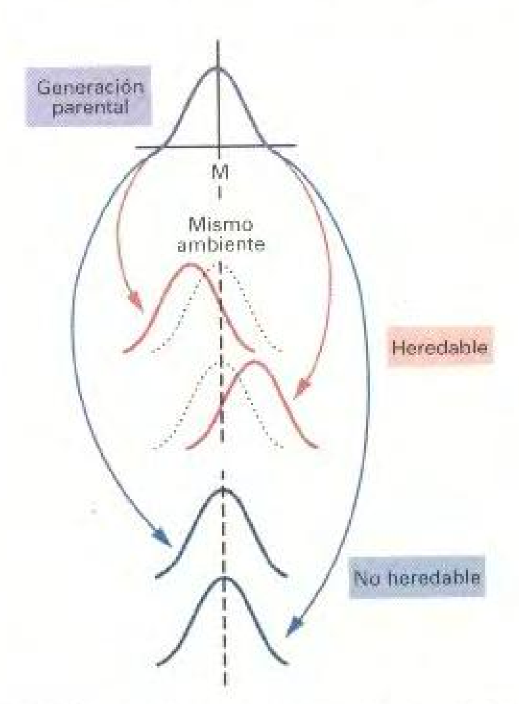


Figura 25-10. Método estándar para comprobar la heredabilidad en organismos de experimentación. Se realizan cruzamientos dentro de dos poblaciones de individuos seleccionados de los extremos de la distribución fenotípica de la generación parental. Si las distribuciones fenotípicas de los dos grupos de descendientes son significativamente diferentes una de otra, el rasgo es heredable. Si ambas distribuciones de los descendientes son como la distribución de la generación parental, el rasgo no es heredable.

COROLARIO

En los organismos experimentales, la semejanza ambiental puede distinguirse a menudo de la semejanza genética (o heredabilidad). En los seres humanos, sin embargo, es muy difícil determinar si un rasgo particular es heredable.

Cómo cuantificar la heredabilidad

Si se demuestra que un rasgo es parcialmente heredable en una población, es posible cuantificar su grado de heredabilidad. Vimos en la Figura 25-3 que la variación entre los fenotipos de una población procede de dos fuentes. En primer lugar, están las diferencias medias entre genotipos; en segundo lugar, cada genotipo exhibe cierta varianza fenotípica a causa de la variación ambiental. La **varianza fenotípica** total de la población (s_p^2) puede descomponerse en dos partes: la varianza de las medias genotípicas (s_g^2), y la varianza restante (s_e^2). La primera se denomina **varianza genética**, y la segunda **varianza ambiental**; sin embargo, como veremos, estos nombres son engañosos. Además, la descomposición de la varianza fenotípica en la suma de varianza ambiental y varianza genética excluye la posibilidad de alguna covarianza entre genotipo y condiciones ambientales. Por ejemplo, supongamos que fuese cierto (no lo sabemos) que existen genes que influyen en la habilidad musical. Padres con esos ge-

nes podrían ser músicos, y sus hijos contarían entonces tanto con los genes como con el ambiente propicio para el fomento de la habilidad musical. El resultado sería un incremento en las varianzas fenotípicas de la habilidad musical, y una estimación errónea de las varianzas genética y ambiental. Si el fenotipo es la suma de un efecto genético y otro ambiental, $P = G + E$, entonces, como se explica en el Apéndice de Estadística, la varianza fenotípica es la suma de la varianza genética, la varianza ambiental y el doble de la covarianza entre los efectos genotípico y ambiental.

$$s_p^2 = s_g^2 + s_e^2 + 2 \text{ cov } ge$$

Si los genotipos no se distribuyen aleatoriamente en las distintas condiciones ambientales, habrá alguna covarianza entre los valores genotípicos y ambientales, que quedará escondida en las varianzas genética y ambiental.

El grado de heredabilidad puede definirse como la proporción de la varianza total que se debe a la varianza genética:

$$H^2 = \frac{s_g^2}{s_p^2} = \frac{s_g^2}{s_g^2 + s_e^2}$$

Así definida, H^2 se denomina **heredabilidad en sentido amplio** del carácter.

Hay que destacar que esta medida de la «influencia genética» nos indica qué proporción de la *variación* fenotípica de la población es asignable a *variación* genotípica. No nos indica qué fracción de un fenotipo *individual* puede asignarse a su herencia o a su ambiente. Esta última distinción no tiene sentido. El fenotipo de un individuo es una consecuencia de la interacción entre sus genes y la secuencia histórica de sus condiciones ambientales. Evidentemente, sería absurdo afirmar que, de la estatura del lector, 1.5 m se deben a los genes y 25 cm al ambiente. Todas las medidas sobre la «importancia» de los genes se han diseñado en términos de la proporción de varianza asignable a la variación genética. Este enfoque es una aplicación especial de la técnica más general del **análisis de la varianza** para estimar la influencia relativa de diferentes causas que contribuyen a cierto efecto. De hecho, el método se ideó originalmente para analizar experimentos sobre diferentes factores ambientales y genéticos que podían influir en el crecimiento de plantas. (Para una descripción detallada pero accesible del análisis de la varianza, escrita para biólogos, véase R. Sokal y J. Rohlf, *Biometry*, 3.ª ed. W. H. Freeman and Company, 1995.)

Métodos de estimación de H^2

La varianza genética y la heredabilidad pueden estimarse de varias maneras. El modo más directo es estimar s_e^2 obteniendo un conjunto de líneas homocigóticas de la población, cruzándolas por pares para reconstituir los individuos heterocigóticos, y midiendo la varianza fenotípica *dentro de* cada genotipo heterocigótico. Como no hay varianza genética en cada clase genotípica, las varianzas proporcionarán (cuando se promedien) una estimación de s_e^2. Luego, puede restarse ese valor al de s_p^2 de la población original y obtener así s_g^2. Utilizando este método, cualquier covarianza entre genotipo y condiciones ambientales en la población original quedará oculta en la estimación de la varianza genética y la aumentará excesivamente.

Pueden obtenerse otros estimadores de la varianza genética considerando el parecido genético entre parientes. A partir de principios mendelianos simples, podemos ver que la mitad (como media) de los genes de dos hermanos son idénticos. Como forma de identificación, podemos marcar de forma diferente los alelos de cada locus de cada progenitor, de manera que serían, digamos, A_1/A_2 y A_3/A_4. Ahora, el primer descendiente tiene una probabilidad $\frac{1}{2}$ de recibir A_1 de su padre, la misma que tiene el segundo descendiente, así que hay una probabilidad de $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$ de que ambos reciban A_1. Por otra parte, ambos podrían haber recibido A_2 de su padre, así que de nuevo hay una probabilidad $\frac{1}{4}$ de que ambos compartan un alelo que han recibido del padre. Por tanto, la probabilidad de que ambos descendientes lleven el alelo A_1 o ambos el alelo A_2 será de $\frac{1}{4} + \frac{1}{4} = \frac{1}{2}$. La otra mitad de las veces uno de los descendientes heredará un alelo A_1 y el otro un alelo A_2. De este modo, en lo que concierne a los genes heredados del padre, los hermanos tienen una probabilidad del 50 % de llevar el mismo alelo. Pero el mismo razonamiento vale para los genes heredados de la madre. Considerando simultáneamente los genes heredados del padre y de la madre, los hermanos comparten la mitad de sus alelos. Su **correlación genética**, que es igual a la probabilidad de que lleven el mismo alelo, es $\frac{1}{2}$.

Si aplicamos este razonamiento a hermanastros, que tienen, digamos, el mismo padre pero madres distintas, obtendremos un resultado diferente. De nuevo, los dos descendientes tienen una probabilidad del 50 % de recibir el mismo alelo del padre, pero en esta ocasión es imposible que hereden alelos idénticos por vía materna, porque las madres son diferentes. La probabilidad de que estos hermanastros lleven un mismo alelo, que se obtiene promediando los genes heredados por vía paterna con los heredados por vía materna, será de $(\frac{1}{2} + 0)/2 = \frac{1}{4}$.

Podríamos tener la tentación de usar la correlación teórica entre, digamos, hermanos, para estimar H^2. Si la correlación fenotípica observada fuera, por ejemplo, 0.4, y esperáramos una correlación de 0.5, en términos puramente genéticos, estimaríamos la heredabilidad como 0.4/0.5 = 0.8. Pero este tipo de estimación no tiene en cuenta el hecho de que los hermanos también están ambientalmente relacionados. A menos que tengamos el cuidado de mantener a los hermanos en condiciones ambientales independientes, la estimación de H^2 sería demasiado alta, y podría incluso exceder de 1 si la correlación fenotípica observada fuera mayor de 0.5. Para resolver este problema, usamos las *diferencias* entre las correlaciones fenotípicas de parientes de distinto grado. Por ejemplo, la diferencia entre la correlación fenotípica entre hermanos y entre hermanastros es $\frac{1}{2} - \frac{1}{4} = \frac{1}{4}$. Comparemos esta diferencia con sus **correlaciones fenotípicas**. Si la semejanza ambiental es la misma para hermanos y hermanastros, condición muy importante para estimar la heredabilidad, entonces tales similitudes ambientales se cancelarán si tomamos la diferencia entre las correlaciones de ambos tipos de parientes. Esta diferencia entre correlaciones fenotípicas será proporcional a la magnitud de la varianza genética. Así:

$$\left(\begin{array}{c}\text{correlación genética}\\ \text{entre hermanos}\end{array}\right) - \left(\begin{array}{c}\text{correlación genética}\\ \text{entre hermanastros}\end{array}\right) = \frac{1}{4}$$

pero

$$\begin{pmatrix}\text{correlación fenotípica}\\ \text{entre hermanos}\end{pmatrix} - \begin{pmatrix}\text{correlación fenopítica}\\ \text{entre hermanastros}\end{pmatrix} = H^2 \times \tfrac{1}{4}$$

así que una estimación de H^2 sería:

$$H^2 = 4\left[\begin{pmatrix}\text{correlación}\\ \text{entre hermanos}\end{pmatrix} - \begin{pmatrix}\text{correlación}\\ \text{entre hermanastros}\end{pmatrix}\right]$$

fórmula en la que hablamos de correlación *fenotípica*.

Podemos emplear los mismos argumentos para semejanzas genéticas entre padres e hijos y entre gemelos para obtener otras estimaciones de H^2:

$$H^2 = 4\begin{pmatrix}\text{correlación}\\ \text{entre hermanos}\end{pmatrix} - 2\begin{pmatrix}\text{correlación}\\ \text{padre-hijos}\end{pmatrix}$$

y

$$H^2 = 2\left[\begin{pmatrix}\text{correlación entre}\\ \text{gemelos monocigóticos}\end{pmatrix} - \begin{pmatrix}\text{correlación entre}\\ \text{gemelos dicigóticos}\end{pmatrix}\right]$$

Estas fórmulas derivan de considerar las similitudes genéticas entre parientes. Sus resultados son sólo aproximados y dependen de ciertas suposiciones sobre la forma de actuar de los genes. Por ejemplo, las dos primeras fórmulas dan por supuesto que los efectos sobre el carácter de genes de distintos loci se suman. La última fórmula también da por supuesto que los alelos de cada locus no muestran dominancia (véase la discusión sobre los componentes de la varianza en las págs. 760-762).

Todos estos estimadores, así como otros basados en correlaciones entre parientes, dependen *de manera crítica* de la suposición de que las correlaciones ambientales entre individuos son las mismas, con independencia de su grado de relación biológica. Si parientes más próximos comparten ambientes más parecidos, como ocurre en los seres humanos, los estimadores de la heredabilidad están sesgados. Es razonable suponer que la mayoría de las correlaciones ambientales entre parientes serán positivas, en cuyo caso se estarían sobrestimando las heredabilidades. También puede haber correlaciones ambientales negativas. Por ejemplo, si los miembros de una camada se ven obligados a competir por alimentos escasos, habrá una correlación negativa entre las tasas de crecimiento de los hermanos.

La diferencia de correlación entre gemelos monocigóticos y dicigóticos se utiliza habitualmente en Genética humana para estimar el valor de H^2 para rasgos intelectuales o relativos a la personalidad. Aquí el problema de la similitud ambiental es muy grave. Los gemelos idénticos (monocigóticos) son tratados generalmente de forma más homogénea que los gemelos no idénticos (dicigóticos). La gente da frecuentemente a sus gemelos idénticos nombres similares, los viste de forma parecida, los trata de la misma forma y, en general, acentúa sus semejanzas. Como resultado, la heredabilidad resulta sobrestimada.

El significado de H^2

La atención prestada al problema de cómo estimar la heredabilidad en sentido amplio nos ha distraído de la cuestión más profunda del significado de ese parámetro, cuando es posible estimarlo. A pesar de su uso generalizado como una medida de la «influencia» de los genes sobre un rasgo, H^2 tiene en realidad un significado especial y limitado.

Dos son las conclusiones que pueden extraerse de un estudio de heredabilidad diseñado adecuadamente. En primer lugar, si el valor de la heredabilidad no es cero, entonces, en la población analizada y en los ambientes en los que se han desarrollado los individuos, las diferencias genéticas han influido en la variación entre individuos, así que tales diferencias genéticas son importantes en la variación del rasgo. Este no es un hallazgo trivial y es el primer paso de una investigación más detallada del papel de los genes. Es importante destacar que lo contrario no es cierto. El hecho de no encontrar heredabilidad para un carácter no demuestra que los genes son irrelevantes; demuestra, más bien, que en la población particular estudiada no hay variación genética en los loci relevantes o que los ambientes en los que se desarrolló la población fueron tales que los diferentes genotipos dieron fenotipos parecidos. En otras poblaciones u otros ambientes, el rasgo podría ser heredable.

COROLARIO

En general, la heredabilidad de un carácter es diferente en cada población y en cada conjunto de ambientes; no puede ser extrapolada de una población y un conjunto de ambientes a otros.

Además, hemos de distinguir entre *genes* que son relevantes para un rasgo y *diferencias genéticas* que son relevantes para las *diferencias* en ese rasgo. El experimento de la inmigración en Norteamérica ha demostrado que la habilidad de pronunciar los sonidos del inglés norteamericano, en lugar del francés, del sueco o del ruso, no es consecuencia de diferencias genéticas entre los antepasados de los inmigrantes. Pero sin los genes apropiados no podríamos hablar en absoluto ninguna lengua.

En segundo lugar, el valor de H^2 no ofrece una buena predicción del efecto de la modificación ambiental bajo circunstancias particulares. Si se elimina toda la variación ambiental relevante *y el nuevo ambiente constante es el mismo que el ambiente medio de la población original*, entonces H^2 estima cuánta variación fenotípica seguirá todavía presente. Así, si la heredabilidad del rendimiento en las pruebas del CI fuera, digamos, 0,4, y si todos los niños tuvieran el mismo ambiente de desarrollo y social que el «niño medio», cerca del 60 % de la variación en el rendimiento en las pruebas del CI desaparecería y permanecería un 40 %.

Para esa predicción, es absolutamente necesario que el nuevo ambiente constante sea la media de la distribución ambiental original. Si el ambiente es desplazado hacia un extremo u otro de la distribución ambiental, o se introduce un nuevo ambiente, no podemos predecir nada en absoluto. En el ejemplo de la realización de las pruebas del CI, la heredabilidad no nos da ninguna información acerca de cuán variable sería el rendimiento si el ambiente de desarrollo y social de los niños fuera enriquecido para todos. Para entender por qué es esto así, hemos de recordar el concepto de norma de reacción.

La descomposición de la varianza en los componentes genético y ambiental, s_g^2 y s_e^2, no separa realmente las causas genéticas

y ambientales de la variación. Considere la Figura 25-9*b*. Cuando el ambiente es pobre (50), la variedad 2 de maíz da lugar a una cosecha mayor que la variedad 1, de modo que una población compuesta por una mezcla de las dos variedades tendría mucha varianza genética para el rendimiento de la cosecha. Pero, en un ambiente de 80 no hay diferencia en las cosechas de los genotipos 1 y 2, de modo que una población mezclada no tendría ninguna varianza genética para el rendimiento de la cosecha en ese ambiente. Por tanto, la varianza *genética* ha cambiado al cambiar el *ambiente*. Por otro lado, la variedad 2 es menos sensible al cambio ambiental que la variedad 1, como muestran las inclinaciones de las rectas. Así que una población con mayor proporción del genotipo 2 tendría una varianza ambiental menor que una población con mayor proporción del genotipo 1. Por tanto, la varianza *ambiental* en la población ha cambiado al cambiar la proporción de los *genotipos*.

COROLARIO

Como genotipo y ambiente interaccionan para generar el fenotipo, ninguna partición de la variación puede separar realmente las causas de la variación.

Como consecuencia del argumento que acabamos de dar, conocer la heredabilidad de un rasgo no nos permite predecir cómo cambiará la distribución de ese rasgo si cambian considerablemente las frecuencias genotípicas o los factores ambientales.

COROLARIO

Una heredabilidad alta no significa que el carácter no sea afectado por el medio ambiente.

Todo lo que una heredabilidad alta significa es que para la población particular que se desarrolla en la distribución particular de ambientes en la que se midió la heredabilidad, las diferencias medias entre genotipos son grandes si se comparan con las variaciones debidas al ambiente dentro de cada genotipo. Si el ambiente cambia, pueden aparecer grandes diferencias fenotípicas.

Quizás el ejemplo más conocido del uso erróneo de argumentos sobre la heredabilidad para hacer ciertas afirmaciones sobre la maleabilidad de un carácter es el caso del rendimiento de las personas en las pruebas del CI y el éxito social. En 1969, un psicólogo de la educación, A. R. Jensen, publicó un largo artículo en el *Harvard Educational Review*, planteando la siguiente pregunta (en su título) «¿Cuánto podemos mejorar el CI y los logros académicos?» La conclusión de Jensen fue que «no mucho». Como explicación y prueba de esa inmutabilidad, ofreció la afirmación de la alta heredabilidad del rendimiento en las pruebas del CI. Se ha criticado mucho la prueba ofrecida por Jensen de la alta heredabilidad de las puntuaciones en las pruebas del CI. Pero independientemente del valor correcto de H^2 para tal carácter, el error real del argumento de Jensen reside en la equiparación de alta heredabilidad con inmutabilidad. En realidad, la heredabilidad del CI es *irrelevante* para la pregunta planteada en el título de su artículo.

Para ver por qué eso es así, consideremos los resultados de los estudios de adopción, en los que los niños fueron separados de sus padres biológicos durante la infancia y criados por padres adoptivos. Aunque los resultados pueden variar cuantitativamente de un estudio a otro, hay tres características comunes a todos ellos. En primer lugar, los padres adoptivos tienen generalmente un CI mayor que los padres biológicos. En segundo lugar, los hijos adoptados obtienen puntuaciones del CI superiores a las de sus padres biológicos. En tercer lugar, el CI de los hijos adoptados muestra una correlación mayor con el de sus padres biológicos que con el de sus familias adoptivas. La tabla siguiente muestra un conjunto hipotético de datos que muestra todas esas características, en forma idealizada, para ilustrar estos conceptos. Los datos de los padres representan la media de la madre y el padre.

	Hijos	Padres biológicos	Padres adoptivos
	110	90	118
	112	92	114
	114	94	110
	116	96	120
	118	98	112
	120	100	116
Media	115	95	115

En primer lugar, podemos ver que los hijos muestran una elevada correlación con sus padres biológicos, pero una baja correlación con sus padres adoptivos. De hecho, en nuestro ejemplo hipotético, la correlación de los hijos con sus padres biológicos es $r = 1.00$, pero con sus padres adoptivos es $r = 0$. (La correlación entre dos conjuntos de números no significa que los dos conjuntos de números sean idénticos, sino que para cada incremento unitario en un conjunto, hay un incremento proporcional constante en el otro conjunto. Véase el Apéndice de Estadística al final de este capítulo). Esta correlación perfecta con los padres biológicos y nula con los padres adoptivos significa que $H^2 = 1$, dados los argumentos detallados anteriormente. Toda la variación entre los hijos en las puntuaciones de las pruebas del CI se explica por la variación de sus padres biológicos.

En segundo lugar, sin embargo, podemos observar que cada una de las puntuaciones del CI de los hijos es 20 puntos más alta que las puntuaciones de sus padres biológicos respectivos, y que la media de las puntuaciones de los hijos es igual a la media de los padres adoptivos. Así pues, la adopción ha elevado el CI de los hijos 20 puntos por encima del CI medio de sus padres biológicos; de modo que, como *grupo*, los hijos se parecen a sus padres adoptivos. Por tanto, existe una heredabilidad perfecta y, sin embargo, hay una alta plasticidad ambiental.

Un investigador preocupado seriamente por averiguar cómo los genes condicionan o influyen en el curso del desarrollo de cualquier rasgo, en cualquier organismo, debe estudiar directamente las normas de reacción de los diversos genotipos de la población en el conjunto de condiciones ambientales previsibles. Ninguna información más limitada servirá. Medidas sumarias como el valor de H^2 no constituyen primeros pasos hacia un análisis más completo y, por consiguiente, no son válidas por sí mismas.

COROLARIO

La heredabilidad no es lo contrario de la plasticidad fenotípica. Un carácter puede presentar una heredabilidad perfecta en una población y estar sujeto así y todo a grandes cambios debidos a variaciones ambientales.

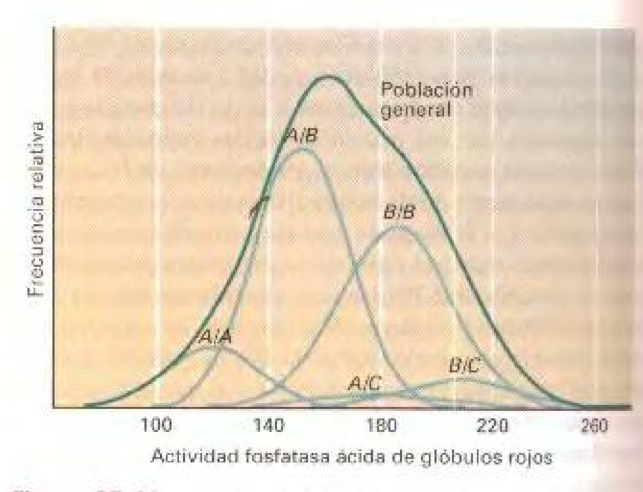


Figura 25-11. Actividad fosfatasa ácida de glóbulos rojos de diferentes genotipos, y distribución de la actividad en una población inglesa compuesta por una mezcla de esos genotipos. (H. Harris, *The Principles of Human Biochemical Genetics*, 3.ª ed. Copyright © 1970 de North Holland.)

Localización de los genes

No es posible identificar todos los genes que influyen en el desarrollo de un rasgo determinado mediante técnicas puramente genéticas. Ello es así incluso para rasgos cualitativos sencillos, como los genes que determinan la configuración antigénica completa de la membrana del glóbulo rojo humano. Actualmente se conocen unos 40 loci que determinan grupos sanguíneos humanos; cada uno de ellos se ha descubierto encontrando al menos una persona con una especificidad inmunológica diferente de la especificidad de otras personas. Puede que queden por descubrir muchos otros loci que determinan la estructura de la membrana del glóbulo rojo, porque todos los individuos estudiados hasta ahora hayan sido idénticos para esos loci. El análisis *genético* detecta genes sólo cuando hay alguna variación alélica. Por el contrario, el análisis *molecular*, al tratar directamente con el DNA y su información traducida, permite identificar genes incluso cuando no varían, siempre que podamos identificar sus productos génicos.

Aunque un rasgo puede manifestar una variación fenotípica continua, la base genética de las diferencias puede ser la variación alélica en un único locus. La mayoría de las mutaciones clásicas de *Drosophila* son fenotípicamente variables en su expresión, y en muchos casos la clase mutante difiere poco del silvestre, de modo que muchos individuos que llevan la mutación son indistinguibles de los normales. Incluso en el caso de los genes del complejo génico bithorax, en los que se conocen mutaciones homeóticas dramáticas que transforman los halterios en alas (véase el Cap. 23), también se conocen alelos débiles que incrementan el tamaño del halterio sólo ligeramente con respecto a la media, de manera que los individuos de genotipo mutante pueden parecer silvestres.

Algunas veces es posible utilizar el conocimiento previo de la bioquímica y del desarrollo de un organismo para adivinar que la variación en un locus conocido es responsable de, al menos, alguna variación en el fenotipo. Este locus es entonces un *gen candidato* en la investigación de la variación fenotípica continua. Un ejemplo es la variación en la actividad de la enzima fosfatasa ácida de los glóbulos rojos humanos. Como estamos tratando de variación de una actividad enzimática, una buena hipótesis sería que existe variación alélica en el locus que determina esa enzima. Cuando H. Harris y D. Hopkinson analizaron muestras de una población inglesa, encontraron que, de hecho, existían tres formas alélicas, *A*, *B* y *C*, con diferentes actividades. El Cuadro 25-2 muestra la actividad media, la varianza de la actividad y la frecuencia de los seis genotipos en la población. La Figura 25-11 muestra la distribución de la actividad en la población completa y las distribuciones de los diferentes genotipos de las que está compuesta. El Cuadro 25-2 muestra que la mitad de la varianza de la actividad en la distribución total (607.8) se explica mediante la varianza media dentro de los genotipos (310.7), así que la otra mitad (607.8 − 310.7 = 297.1) se explica por la varianza entre las medias de los seis genotipos. Aunque gran parte de la variación en la actividad se explica por las diferencias entre las medias de los genotipos, persiste algo de variación dentro de cada genotipo, que puede ser el resultado de influencias ambientales o de la segregación de otros genes, aún no identificados. Esta explicación parcial de la variación mediante alelos en un solo locus identificado es típica de lo que se encuentra por el método del gen candidato, y la proporción de varianza asociada a un solo locus es normalmente menor que la encontrada para la fosfatasa ácida. Por ejemplo, los tres alelos comunes del gen *apoE*, que determina la proteína apoliproteína E explican sólo alrededor del 16 % de la varianza en los niveles sanguíneos de lipoproteínas de baja densidad, que transportan colesterol y están implicadas en los niveles excesivos de colesterol.

CUADRO 25-2. Actividad fosfatasa ácida de glóbulos rojos de diferentes genotipos de la población inglesa

Genotipo	Actividad media	Varianza de la actividad	Frecuencia en la población
A/A	122.4	282.4	0.13
A/B	153.9	229.3	0.43
B/B	188.3	380.3	0.36
A/C	183.8	392.0	0.03
B/C	212.3	533.6	0.05
C/C	~240	—	0.002
Media general	166.0	310.7	
Distribución total	166.0	607.8	

Nota: las medias están ponderadas según su frecuencia en la población.
Fuente: H. Harris, *The Principles of Human Biochemical Genetics*, 3.ª ed. North-Holland, 1980.

Segregación de genes marcadores

Los genes en segregación para un rasgo cuantitativo, denominados *loci de rasgos cuantitativos* o QTL (del inglés *quantitative*

trait loci), no pueden identificarse individualmente en la mayoría de los casos. No obstante, es posible localizar aquellas regiones del genoma donde se encuentran los loci relevantes y estimar cuánta de la variación total se explica mediante la variación del QTL de cada región. Este análisis se realiza en organismos experimentales mediante el cruzamiento de dos líneas que difieren notablemente en el rasgo cuantitativo y que difieren además en alelos de loci bien conocidos, *genes marcadores*, cuyos diferentes genotipos pueden distinguirse por criterios tales como algún efecto fenotípico visible que es independiente del rasgo cuantitativo (digamos, el color del ojo en *Drosophila*), por la movilidad electroforética de las proteínas que determinan o por la secuencia de DNA de los propios genes. La F_1 del cruzamiento entre las dos líneas se cruza entonces consigo misma para obtener una F_2 segregante, o bien puede cruzarse con una de las líneas parentales. Si existen QTL estrechamente ligados a un gen marcador, entonces los diferentes genotipos marcadores en la generación que segrega llevarán también los alelos QTL ligados a ellos en las líneas parentales originales. Por tanto, los diferentes genotipos marcadores en la F_2 o en el retrocruzamiento tendrán fenotipos medios distintos para el carácter cuantitativo.

Análisis de ligamiento

La localización de los QTL en pequeñas regiones de los cromosomas requiere la existencia de loci marcadores próximos unos a otros a lo largo del cromosoma. Además, hay que contar con líneas parentales que difieran entre sí en los alelos de esos loci. Durante la mayor parte de la historia de la Genética, tales requerimientos no pudieron cumplirse, incluso en una especie tan bien conocida como *Drosophila*, debido a que la mayoría de los loci marcadores se conocieron a partir de mutantes con defectos morfológicos graves, que tenían efectos deletéreos sobre la viabilidad y la fecundidad de sus portadores. En consecuencia, no era posible crear una línea que llevara un gran número de alelos mutantes que la distinguieran de una línea alternativa portadora de los alelos silvestres. Con el advenimiento de las técnicas moleculares, que pueden detectar polimorfismos genéticos en el DNA (véase el Cap. 24), se ha descubierto una gran densidad de loci variables a lo largo de los cromosomas de todas las especies. Particularmente útiles son los polimorfismos en las dianas de restricción y las repeticiones en tándem en el DNA (Cap. 24). Tales polimorfismos son tan comunes que cualquier pareja de líneas seleccionadas por su diferencia en rasgos cuantitativos son también, con seguridad, diferentes entre ellas en loci marcadores moleculares conocidos, separados unos de otros por unas pocas unidades de recombinación y distribuidos a lo largo de cada cromosoma.

Un protocolo experimental para localizar los genes hace uso de grupos de individuos que difieren notablemente en el rasgo cuantitativo y también en loci marcadores. Estos grupos pueden obtenerse mediante un número de generaciones de selección divergente para crear líneas extremas, o pueden aprovecharse variedades ya existentes de grupos de familias que difieren mucho en el rasgo. Han de examinarse entonces estas líneas para encontrar loci marcadores que sean diferentes entre ellas. Se realiza un cruce entre las dos líneas, y se cruza la F_1 consigo misma para producir una F_2 segregante, o se cruza con una de las líneas parentales en un retrocruzamiento segregante. Se analiza entonces el rasgo cuantitativo de un gran número de descendientes de la generación segregante, así como su genotipo para los loci marcadores. Un locus marcador que no esté ligado o esté muy poco ligado a cualquier QTL irá asociado al mismo valor medio del rasgo cuantitativo para todos sus genotipos, mientras que un locus muy ligado a algún QTL irá asociado a un valor fenotípico medio para el rasgo que variará de uno a otro de sus genotipos. La diferencia en el fenotipo medio entre los distintos genotipos de un locus marcador dependerá tanto de la fuerza del efecto de los QTL como del grado de ligamiento entre los QTL y los loci marcadores. Suponga, por ejemplo, que existen dos líneas seleccionadas que difieren en un total de 100 unidades en algún carácter cuantitativo, y que la línea de valor más alto es homocigótica +/+ para el QTL, mientras que la línea de valor más bajo es homocigótica −/−, y que cada alelo + del QTL da cuenta de cinco unidades de la diferencia total entre las líneas. Suponga además que la línea de valor más alto es *M/M* y la línea de valor más bajo es *m/m* para un locus marcador que está a 10 unidades de recombinación del QTL. Entonces, como muestra la Figura 25-12, en la F_2 segregante hay 4 unidades de diferencia media entre un gameto portador de un alelo *M* y un gameto portador de un alelo *m*, u 8 unidades de diferencia entre las dos líneas homocigóticas originales. Por tanto, hemos dado cuenta del 8% de la diferencia media entre las líneas, aunque el QTL explica realmente el 10% de esa diferencia. La discrepancia se debe a la recombinación entre el gen marcador y el QTL.

Esta técnica se ha utilizado para localizar segmentos de cromosomas asociados con rasgos tales como el peso de los frutos del tomate, el número de cerdas de *Drosophila* o ciertos rasgos vegetativos del maíz. En el caso del maíz, se han examinado 82

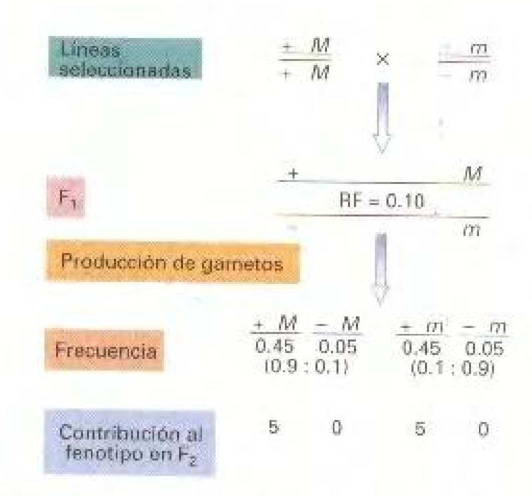


Figura 25-12. Resultado de un cruzamiento entre dos líneas seleccionadas que difieren en un QTL y en un marcador molecular separado del QTL por 10 unidades de recombinación. El alelo QTL + añade 5 unidades al fenotipo.

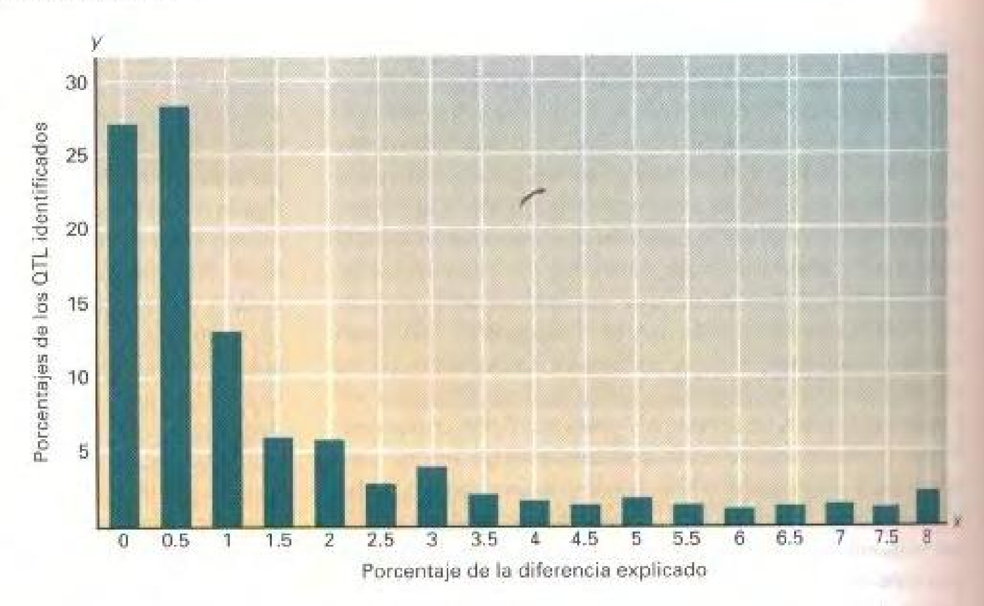


Figura 25-13. Distribución de las asociaciones de las diferencias en distintos caracteres entre dos líneas de maíz con una serie de marcadores de DNA. El eje de abscisas muestra el porcentaje de la diferencia entre las dos líneas para un determinado carácter que resulta explicada por la asociación con algún gen marcador. El eje de ordenadas muestra la proporción de todos los QTL identificados que ofrecen explicación de ese porcentaje de la diferencia entre las líneas. Observe que el 55 % de todas las asociaciones (suma de las dos primeras columnas) dan cuenta de menos del 1 % de las diferencias entre caracteres. (Según M. Lynch y B. Walsh, *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, 1998. Datos de M. D. Edwards, C. W. Stuber y J. F. Wendel, *Genetics* 116, 1987, 113-125.)

caracteres vegetativos en un cruzamiento entre líneas que diferían en 20 marcadores de DNA. Como media, cada carácter mostró asociación significativa con 14 marcadores distintos, pero la fracción de la diferencia entre las líneas que podía explicarse por cada locus marcador era, en general, muy pequeña. La Figura 25-13 muestra la proporción de asociaciones significativas marcador-carácter (en el eje de ordenadas) que daba cuenta de diferentes fracciones de la diferencia entre las líneas para un determinado carácter. Como muestra la Figura 25-13, la mayoría de las asociaciones daban cuenta de menos del 1 % de esa diferencia.

En muchos organismos (como los seres humanos), no es posible generar líneas homocigóticas que difieran en algún carácter, para cruzarlas después y obtener una generación segregante. En tales casos, puede hacerse uso de las diferencias entre hermanos portadores de distintos alelos de loci marcadores y cuyos progenitores eran heterocigóticos para esos marcadores. Este procedimiento es mucho menos resolutivo para encontrar QTL, en especial si el número de hijos en cualquier familia es pequeño, como es el caso de las familias humanas. Como consecuencia, los intentos de cartografiar QTL para distintos rasgos humanos cuantitativos no han tenido mucho éxito, aunque el análisis de marcadores segregantes sí ha tenido éxito en el descubrimiento de loci cuyas mutaciones son responsables de enfermedades monogénicas.

Más sobre el análisis de la varianza

Conocer la heredabilidad en sentido amplio (H^2) de un rasgo en una población no es muy útil en sí mismo, pero una subdivisión más fina de la varianza fenotípica puede proporcionar una información importante para los mejoradores de plantas y animales. Tanto la variación genética como la variación ambiental pueden subdividirse aún más, de manera que proporcionen información sobre la acción de los genes y sobre la posibilidad de moldear la composición genética de una población.

Varianza aditiva y debida a dominancia

Nuestras consideraciones previas sobre la acción génica sugieren que debe haber una relación sencilla entre los fenotipos de los homocigotos y de los heterocigotos. Si uno de los alelos determina un producto génico menos activo o uno carente por completo de actividad, y una sola copia del alelo silvestre bastara para que la actividad fisiológica del organismo fuera completamente normal, esperaríamos una dominancia completa de un alelo sobre el otro, como observó Mendel en el caso del color de las flores del guisante. Si no fuera así, y la actividad fisiológica fuera proporcional a la concentración de producto génico activo, esperaríamos que el fenotipo del heterocigoto fuera exactamente intermedio entre el de los homocigotos (sin dominancia).

Para muchos caracteres cuantitativos, sin embargo, ninguno de esos dos casos sencillos resulta ser la regla. En general, los heterocigotos no son exactamente intermedios entre los dos homocigotos, sino que se parecen más a uno u otro (muestran dominancia parcial), aunque el heterocigoto contenga una mezcla igual de los productos primarios de los dos alelos. En realidad, en algunos casos, el fenotipo del heterocigoto cae fuera del rango fenotípico de ambos homocigotos, situación que se conoce como **superdominancia**. Por ejemplo, los recién nacidos de tamaño intermedio tienen mayor probabilidad de sobrevivir que los recién nacidos muy grandes o muy pequeños. De modo que si la supervivencia fuera el fenotipo de interés, los heterocigotos para genes que modifiquen la tasa de crecimiento mostrarían superdominancia para la eficacia biológica, aunque no para la tasa de crecimiento.

Supongamos que existen dos alelos, *a* y *A*, para un locus que afecta a la altura. En los ambientes en que se desarrolla la población, los fenotipos medios (alturas) y las frecuencias de los tres fenotipos podrían ser:

	a/a	*A/a*	*A/A*
Fenotipo	10	18	20
Frecuencia	0.36	0.48	0.16

Hay varianza genética en la población; las medias fenotípicas de las tres clases genotípicas son distintas. Parte de la variación se debe a que la sustitución de un alelo *a* por otro *A* produce un efecto medio sobre el fenotipo; es decir, la altura media de todos los individuos con alelos *A* es mayor que la de todos los individuos con alelos *a*. Al definir el efecto medio de un alelo como el fenotipo medio de todos los individuos que lo llevan, hacemos depender necesariamente el efecto medio del alelo de las frecuencias de los genotipos.

El efecto medio se calcula contando simplemente los alelos *a* y *A*, y multiplicándolos por las alturas de los individuos en los que aparecen. Así, 0.36 de todos los individuos son homocigóticos *a/a*, cada individuo *a/a* posee dos alelos *a*, y la altura media de los individuos *a/a* es 10 cm. Los heterocigotos constituyen el 0.48 de la población, cada uno con un alelo *a*, y el valor fenotípico medio de los individuos *A/a* es 18 cm. La fracción total de alelos *a* es 2(0.36) + 1(0.48). Por tanto, el efecto medio de todos los alelos *a* es:

$$\bar{a} = \text{efecto medio de } a = \frac{2(0.36)(10) + 1(0.48)(18)}{2(0.36) + 1(0.48)} = 13.20 \text{ cm}$$

y, por el mismo argumento,

$$\bar{A} = \text{efecto medio de } A = \frac{2(0.16)(20) + 1(0.48)(18)}{2(0.16) + 1(0.48)} = 18.80 \text{ cm}$$

Esta diferencia media de 5.60 cm entre el efecto de los alelos *A* y *a* da cuenta de parte de la varianza fenotípica, pero no de toda. El heterocigoto no es exactamente intermedio entre los homocigotos; hay algún efecto de dominancia.

Nos gustaría distinguir entre el llamado **efecto aditivo** de la sustitución de alelos *a* por *A* de la variación debida a la dominancia. La razón es que el efecto de la mejora selectiva depende de la variación aditiva y no de la variación debida a dominancia. De modo que, para los objetivos de la mejora genética animal o vegetal, o para hacer predicciones sobre la evolución por selección natural, debemos ser capaces de determinar la variación aditiva. Un ejemplo extremo ilustrará este postulado. Supongamos que existe superdominancia, y que las medias fenotípicas y las frecuencias de tres genotipos son:

	A/A	*A/a*	*a/a*
Fenotipo	10	12	10
Frecuencia	0.25	0.50	0.25

Resulta aparente (y un cálculo como el precedente lo confirmaría) que no hay diferencia media entre los alelos *A* y *a*, porque cada uno tiene un efecto de 11 unidades. Así que no hay varianza *aditiva*, aunque hay una clara diferencia fenotípica entre los genotipos. Los individuos mayores son los heterocigotos. Si un mejorador intentara incrementar la altura de la población mediante cruzamientos selectivos, cruzar entre sí a los heterocigotos simplemente reconstituiría la población original. La selección sería completamente inefectiva. Este ejemplo ilustra la ley general que establece que el efecto de la selección depende de la variación genética *aditiva* y no de la variación genética en general.

Hemos dividido la variación genética total de una población en **variación genética aditiva** (s_a^2), la varianza que se produce porque hay una diferencia media entre los portadores de alelos *a* y los portadores de alelos *A*, y un componente denominado **varianza debida a dominancia** (s_d^2), que deriva del hecho de que los heterocigotos no son exactamente intermedios entre los homocigotos. Así,

$$s_g^2 = s_a^2 + s_d^2$$

En el primer ejemplo, en el que *a/a* = 10, *A/a* = 18 y *A/A* = 20, los componentes de la varianza podían calcularse empleando las definiciones de media y varianza que presentamos al comienzo de este capítulo. Recordando que una media es la suma de los valores de una variable, ponderados cada uno de ellos por la frecuencia con la que aparece, podemos calcular el fenotipo medio como:

$$\bar{x} = \Sigma f_i x_i = (0.36)(10) + (0.48)(18) + (0.16)(20) = 15.44 \text{ cm}$$

La varianza genética total que deriva de la variación entre los fenotipos medios de los tres genotipos es:

$$\begin{aligned} s_g^2 &= \Sigma f_i (x_i - \bar{x})^2 = (0.36)(10 - 15.44)^2 \\ &\quad + (0.48)(18\text{-}15.44)^2 \\ &\quad + (0.16)(20 - 15.44)^2 \\ &= 17.13 \text{ cm}^2 \end{aligned}$$

La frecuencia del alelo *a* es (contando los alelos)

$$f_a = \frac{2(a/a) + 1(A/a)}{2} = \frac{2(0.36) + 1(0.48)}{2} = 0.60$$

y la frecuencia del alelo *A* es

$$f_A = \frac{2(A/A) + 1(A/a)}{2} = \frac{(0.16) + 1(0.48)}{2} = 0.40$$

Por tanto, la varianza de la media alélica es:

$$\begin{aligned} s^2 &= f_a(\bar{a} - \bar{x})^2 + f_A(\bar{A} - \bar{x})^2 \\ &= (0.6)(13.20 - 15.44)^2 + (0.40)(18.80 - 15.44)^2 \\ &= 7.525 \text{ cm}^2 \end{aligned}$$

Pero deseamos conocer la varianza entre individuos diploides que deriva de los efectos alélicos, y cada individuo diploide lleva dos alelos; de manera que:

$$s_a^2 = (2)(7.525) = 15.05 \text{ cm}^2$$

y

$$s_d^2 = s_g^2 - s_a^2 = 17.13 - 15.05 = 2.08 \text{ cm}^2$$

La varianza fenotípica total se puede escribir ahora como

$$s_p^2 = s_g^2 + s_e^2 = s_a^2 + s_d^2 + s_e^2$$

Definimos una nueva clase de heredabilidad, la **heredabilidad en sentido estricto** (h^2), como

$$h^2 = \frac{s_a^2}{s_p^2} = \frac{s_a^2}{s_a^2 + s_d^2 + s_e^2}$$

Es esta heredabilidad, que no debe confundirse con H^2, la que es útil para determinar si un programa de selección tendrá éxito en

cambiar la población. Cuanto más grande sea h^2, mayor será la fracción de diferencia entre los progenitores seleccionados y la población en su conjunto que se conservará en la descendencia de tales progenitores seleccionados.

COROLARIO

El efecto de la selección depende de la magnitud de la varianza genética *aditiva* y no de la varianza genética en general. En consecuencia, la heredabilidad estricta h^2, y no la heredabilidad amplia H^2, es la relevante para predecir la respuesta a la selección.

Aquello que hemos descrito como varianza «debida a dominancia» es en realidad una magnitud más complicada. Se trata de toda la variación genética que no puede explicarse por el efecto medio de sustituir a por A. Si hay más de un locus que afecta al carácter, cualquier interacción epistática entre loci aparecerá como una varianza no asociada con el efecto medio de la sustitución de alelos del locus A. En teoría, podemos separar esta **varianza debida a interacción** (s_I^2) de la varianza debida a dominancia (s_D^2). En la práctica, sin embargo, tal separación no puede hacerse con garantía alguna de precisión, así que toda la varianza no aditiva aparece como varianza «debida a dominancia».

Estimación de los componentes de la varianza genética

Los componentes genéticos de la varianza pueden estimarse a partir de la covarianza entre parientes, pero la derivación de estas estimaciones va más allá del objetivo de un texto elemental.

Existe, sin embargo, otro modo de estimar h^2 que revela además su significado real. Si representamos los fenotipos filiales contra los fenotipos medios de sus dos progenitores (el valor parental medio), podremos observar una relación como la de la Figura 25-14. La recta de regresión pasará por la media de todos los progenitores y por la media de todos los descendientes, que serán iguales porque no ha habido ningún cambio en la población entre ambas generaciones. Además, los progenitores más altos tienen hijos más altos y los progenitores más bajos tienen hijos más bajos, así que la pendiente de la recta es positiva. Pero el valor de la pendiente no es 1: los progenitores muy bajos tienen hijos algo más altos y los progenitores más altos tienen hijos algo más bajos que ellos. Esta pendiente menor que la unidad de la recta de regresión se debe a que la heredabilidad no es perfecta del todo. Si el fenotipo se heredase de forma aditiva con total fidelidad, entonces la altura de los descendientes sería idéntica al valor del parental medio y la pendiente de la recta sería 1. Por otra parte, si los descendientes no tuvieran parecido hereditario alguno con sus progenitores, todos estos tendrían hijos de la misma altura media y la pendiente de la recta de regresión sería 0. Esto sugiere que la pendiente de la recta de regresión del valor filial respecto del valor del parental medio es un estimador de la heredabilidad aditiva. De hecho, esa relación es exacta.

El hecho de que la pendiente sea igual a la heredabilidad aditiva nos permite emplear ahora h^2 para predecir los efectos de la selección artificial. Supongamos que seleccionamos como progenitores de la siguiente generación a unos que como media es-

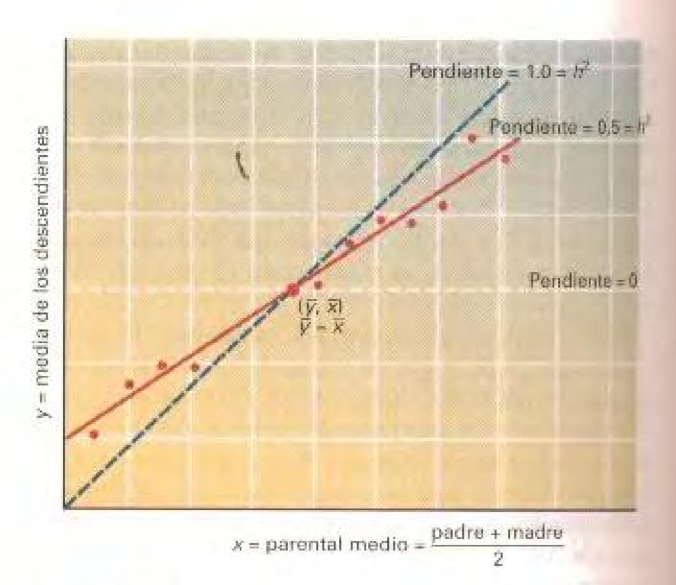


Figura 25-14. Regresión (recta roja) de los valores de los descendientes (y) sobre el valor medio de los parentales (x) para un rasgo con una heredabilidad en sentido estricto (h^2) de 0.5. La recta azul muestra la pendiente de la regresión si el rasgo fuera perfectamente heredable.

tán 2 unidades por encima de la media general de la población de la que procedían. Si $h^2 = 0.5$, la descendencia que forma la siguiente generación, ya seleccionada, caerá $0.5(2.0) = 1.0$ unidad por encima de la media de la población original, ya que el coeficiente de regresión predice cuánto se incrementará y por cada incremento unitario de x. Podemos definir el **diferencial de selección** como la diferencia entre la media de los progenitores seleccionados y la media general de la población, y el **progreso de selección** como la diferencia entre la media de los descendientes de los progenitores seleccionados y la media de la población de la generación anterior. Entonces:

$$\text{Progreso de selección} = h^2 \times \text{diferencial de selección}$$

o

$$h^2 = \frac{\text{progreso de selección}}{\text{diferencial de selección}}$$

Esta segunda expresión nos da aún otra manera de estimar h^2: aplicar la selección en una generación y comparar la respuesta con el diferencial de selección. Habitualmente, esto se hace durante varias generaciones y se utiliza la respuesta media.

Recuerde que cualquier estimación de h^2, al igual que de H^2, parte del supuesto de que la correlación ambiental entre parientes próximos no es mayor de lo normal. Además, el valor de h^2 en una población y en un conjunto de condiciones ambientales no será igual al valor de h^2 en otra población y otro momento distinto. La Figura 25-15 muestra la diversidad de heredabilidades obtenida en varios estudios para cierto número de rasgos de las gallinas. Los intervalos muy pequeños están generalmente próximos a cero. Para la mayoría de los rasgos para los que se ha obtenido una heredabilidad sustancial en alguna población, hay grandes diferencias de un estudio a otro.

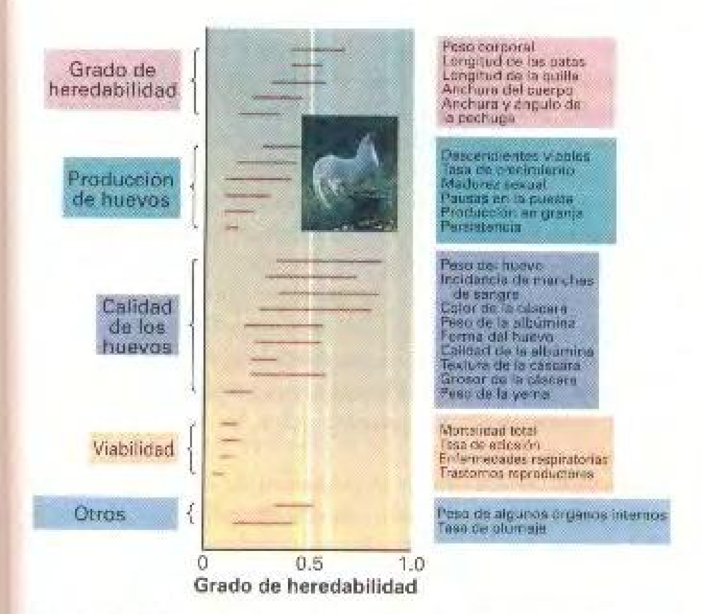


Figura 25-15. Rango de heredabilidades (h^2) publicadas para diversos caracteres de gallinas. (De I. M. Lerner y W. J. Libby, *Heredity, Evolution and Society*. Copyright © 1976, de W. H. Freeman and Company. Fotografía © Kenneth Thomas/Photo Researches.)

Uso de h^2 en la mejora genética

Aunque el valor de h^2 sirva sólo para una población particular y un conjunto determinado de condiciones ambientales, es de gran importancia para los mejoradores. Un genetista de gallinas interesado en incrementar, digamos, la tasa de crecimiento no se preocupa de la varianza genética de todas las posibles granjas de pollos ni de todas las distribuciones ambientales. Dada una granja particular (o una posible elección entre unas pocas granjas particulares) sujeta a las condiciones ambientales normales hoy día en avicultura, la cuestión es: ¿puede diseñarse un esquema de selección que incremente la tasa de crecimiento? Y, si es así, ¿con qué rapidez ocurrirá? Si en una granja hay mucha varianza genética y en otra hay poca, el mejorador escogerá la primera para realizar la selección. Si la heredabilidad de la granja escogida es muy alta, la media de la población responderá rápidamente a la selección impuesta, porque la mayor parte de la superioridad de los progenitores seleccionados aparecerá en la descendencia. Cuanto mayor sea h^2, mayor será la correlación progenitores-descendientes. Si, por el contrario, h^2 es pequeña, sólo una pequeña fracción del incremento de la tasa de crecimiento de los progenitores seleccionados tendrá reflejo en la siguiente generación.

Si h^2 es muy pequeña, se necesitaría algún esquema alternativo de selección o de crianza. En este caso, tanto H^2 como h^2 pueden ser de utilidad para el mejorador. Supongamos que H^2 y h^2 son pequeñas, lo cual significa que hay mucha varianza ambiental en comparación con la varianza genética. Se necesita algún procedimiento para reducir s_e^2. Un método sería cambiar las condiciones de crianza, de manera que se reduzca la varianza ambiental. Otro sería utilizar la **selección familiar**. Más que escoger a los mejores individuos, el mejorador permite que las parejas produzcan varios descendientes, y el *apareamiento* se escoge en base al rendimiento medio de la descendencia. Al promediar la prole, la variación ambiental incontrolada y la variación debida al ruido de desarrollo son anuladas, y se obtiene una mejor estimación de las diferencias genotípicas entre parejas, de modo que pueden escogerse las mejores parejas como progenitores de la siguiente generación.

Si, por otra parte, h^2 es baja pero H^2 es alta, ello significa que no hay mucha varianza ambiental. El bajo valor de h^2 se debe a que la magnitud de la varianza genética aditiva es pequeña en comparación con la varianza debida a dominancia y a interacciones. Tal situación requiere esquemas especiales de mejora, que hacen uso de la varianza no aditiva. Un esquema así es el **método de hibridación-endogamia**, de uso casi universal en el maíz. Se crea un gran número de líneas endogámicas por autofecundación. Posteriormente, se cruzan estas líneas en muchas combinaciones diferentes (todas las combinaciones, si es económicamente posible) y se escoge el cruzamiento que genera el mejor híbrido. Entonces se obtienen nuevas líneas endogámicas a partir de este híbrido óptimo, y de nuevo se realizan cruzamientos para encontrar el mejor híbrido del segundo ciclo. Este esquema permite seleccionar los efectos de la dominancia, porque escoge los mejores heterocigotos; ha sido la base de las principales mejoras genéticas en las cosechas de maíz híbrido de Norteamérica, desde 1930. El rendimiento productivo del maíz no parece tener un componente muy grande de varianza genética no aditiva, así que puede discutirse si esta técnica produce *en última instancia* variedades más productivas que las que se habrían obtenido al aplicar durante varios años técnicas simples de selección basadas en la varianza aditiva.

El método de los híbridos se ha introducido en la mejora de toda clase de plantas y animales. Tomates y pollos, por poner dos ejemplos, son en la actualidad casi exclusivamente híbridos. Se han hecho también intentos de generar trigo híbrido, pero hasta ahora los trigos híbridos obtenidos no dan consistentemente mejores cosechas que las variedades no híbridas empleadas en la actualidad.

COROLARIO

La subdivisión de la variación genética y de la variación ambiental nos proporciona información de interés sobre la acción génica, que puede utilizarse en la mejora vegetal y animal.

RESUMEN

Muchos, quizá la mayoría, de los rasgos distinguibles en los organismos varían de forma continua. En muchos casos, la variación del rasgo se debe a la segregación de más de un locus. Cada uno de estos loci puede contribuir por igual a un fenotipo particular, pero es más probable que lo hagan de forma desigual. En estos casos, las medidas de los fenotipos y la determinación de

las contribuciones de alelos específicos a la distribución fenotípica deben hacerse mediante análisis estadísticos. Algunas de esas variaciones fenotípicas (como la altura de algunas plantas) pueden exhibir una distribución normal en torno a un valor medio; otras (como el peso de la semilla de ciertas plantas) mostrarán una distribución sesgada en torno al valor medio.

En otros casos, la variación de un carácter puede estar correlacionada con la variación de un segundo carácter. Para estas variables, puede calcularse un coeficiente de correlación.

Un carácter cuantitativo es aquél para el que las diferencias fenotípicas medias entre genotipos son pequeñas comparadas con la variación entre individuos del mismo genotipo. Esta situación puede darse incluso en caracteres influidos por alelos de un único locus. La distribución ambiental se refleja biológicamente en una distribución de fenotipos. La transformación de la distribución ambiental en la distribución fenotípica viene determinada por la norma de reacción. Las normas de reacción pueden estudiarse en organismos para los que puede obtenerse un gran número de individuos genéticamente idénticos.

Mediante el uso de cromosomas marcados genéticamente, es posible determinar las contribuciones relativas de diferentes cromosomas a la variación de un rasgo cuantitativo, observar fenómenos de dominancia y de epistasia en cromosomas enteros y, en algunos casos, cartografiar los genes en segregación que afectan a cierto rasgo.

Los rasgos son familiares si, por cualquier razón, son comunes a los miembros de una misma familia. Los rasgos son hereditarios, en cambio, sólo si la semejanza nace de compartir genotipos comunes. En organismos experimentales, las similitudes ambientales pueden distinguirse fácilmente de las semejanzas genéticas, o heredabilidad. En los seres humanos, sin embargo, es muy difícil determinar si un rasgo particular es heredable. Los estudios sobre normas de reacción muestran sólo pequeñas diferencias entre genotipos, y estas diferencias no son consistentes en un amplio rango de ambientes. Por tanto, puede resultar que los genotipos «superiores» de animales domésticos y plantas cultivadas lo sean sólo en ciertos ambientes. Si resultara que los seres humanos presentaran cierta variación genética para diversos rasgos mentales y emocionales, es improbable que esta variación favoreciese a un genotipo sobre los demás en toda la diversidad de ambientes.

El intento de cuantificar la influencia de los genes sobre un rasgo particular ha conducido a la determinación de la heredabilidad en sentido amplio (H^2). En general, la heredabilidad de un rasgo es diferente en cada población y en cada conjunto de ambientes, y no puede extrapolarse de una población a otra, ni de un conjunto de condiciones ambientales a otro. Como H^2 caracteriza sólo a las poblaciones actuales en los ambientes actuales, carece por completo de valor como instrumento predictivo. La heredabilidad en sentido estricto, h^2, mide la proporción de la variación fenotípica que resulta de sustituir un alelo por otro. Esta magnitud, si es grande, predice que la selección para un rasgo tendrá éxito rápidamente. Si h^2 es pequeña, se requieren formas especiales de selección.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

variación cuantitativa / poligenes / ley de Mendel / norma de reacción / medio ambiente / heredabilidad / varianza / respuesta a la selección / varianza aditiva / QTL

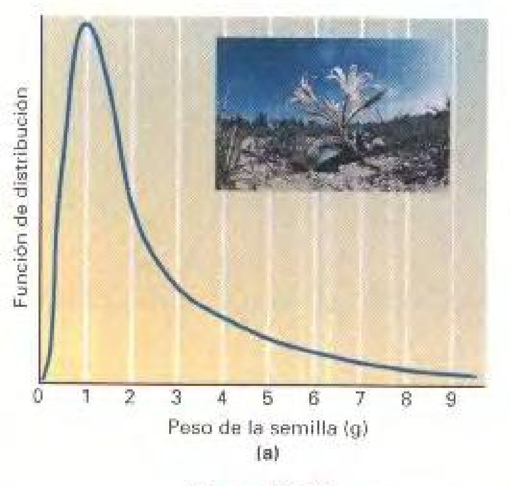
APÉNDICE DE ESTADÍSTICA

Medidas de la tendencia central

La moda. La mayoría de las distribuciones de fenotipos son aproximadamente como las de la Figura 25-2: una clase única más frecuente, la **moda**, se localiza cerca del punto medio de la distribución, con frecuencias decrecientes a ambos lados. Sin embargo, existen excepciones a este patrón. La Figura 25-16*a* muestra una distribución muy asimétrica de los pesos de las semillas de la planta *Crinum longifolium*. La Figura 25-16*b* muestra una distribución **bimodal** (con dos modas) de las probabilidades de supervivencia de larvas de *Drosophila willistoni* que llevan diferentes versiones del segundo cromosoma en homocigosis.

Una distribución bimodal puede indicar que la población en estudio podría ser considerada mejor como una mezcla de dos poblaciones, cada una con su propia moda. En la Figura 25-16*b*, la moda de la izquierda representa probablemente una subpoblación de mutaciones graves en un solo locus que resultan extremadamente deletéreas en homocigosis, pero cuyos efectos no se manifiestan en el estado de heterocigosis en el que están habitualmente en las poblaciones naturales. La moda de la derecha es parte de la distribución de modificadores de la viabilidad «normal» de efecto pequeño.

La media. Una información completa sobre la distribución de un fenotipo en una población únicamente puede darse especificando la frecuencia de cada clase analizada, pero puede resumirse mucha información en dos parámetros estadísticos. En primer lugar, necesitamos alguna medida de la localización de la distribución a lo largo del eje de medidas (por ejemplo, ¿tienden a agruparse las medidas individuales en torno a 100 ó 200 cm?). Una posibilidad es dar la medida de la clase más común, la moda. En la Figura 25-2*b*, la moda es 172 cm (para las mujeres, la moda sería alrededor de 6 cm menos). Una medida más habitual de localización es la media aritmética, o **media**. La media de la medida ($\bar{x}$) es simplemente la suma de todas las medidas (x_i) dividida entre el número de medidas en la muestra (N):



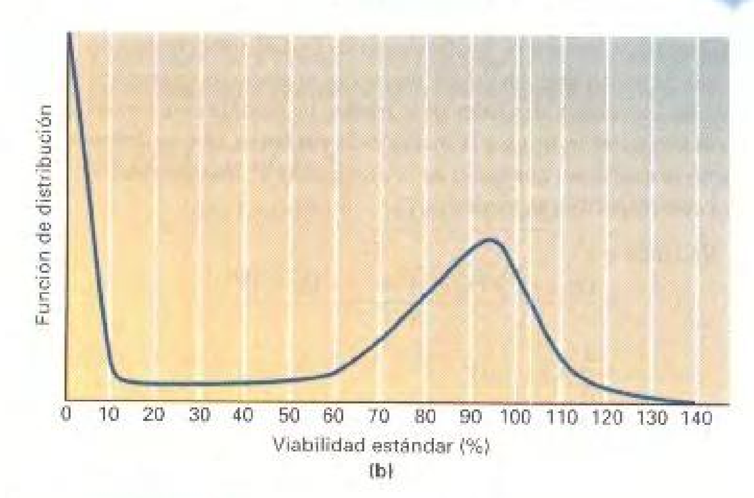


Figura 25-16. Funciones de distribución asimétricas: (a) distribución asimétrica del peso de la semilla de *Crinum longifolium*; (b) distribución bimodal de la supervivencia de *Drosophila willistoni*, expresada como porcentaje de la supervivencia estándar. (Según S. Wright, *Evolution and Genetics of Populations*, Vol. 1, Copyright © 1968 de University of Chicago Press, 1968. Fotografía: Earth Scenes/© Thompson GOSF).

$$\text{media} = \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \cdots + x_N}{N} = \frac{1}{N}\,\Sigma x_i$$

donde Σ representa el sumatorio y x_i es la medida i-ésima.

En una muestra amplia típica, el mismo valor aparecerá más de una vez porque varios individuos tendrán el mismo valor, dada la precisión limitada del instrumento de medida.

En tal caso, puede escribirse ($\bar{x}$ como la suma de todos los valores observados, cada uno de ellos ponderado por su frecuencia en la población. Supongamos que, de un total de N individuos medidos, n_1 caen en la clase de valor x_1, que n_2 caen en la clase de valor x_2, y así sucesivamente, de modo que $\Sigma n_i = N$. Si f_i es la **frecuencia relativa** de la clase de medida i-ésima, de modo que

$$f_i = \frac{n_i}{N}$$

podemos volver a escribir la media como

$$\bar{x} = f_1x_1 + f_2x_2 + f_3x_3 + \cdots + f_kx_k = \Sigma f_ix_i$$

donde x_i es igual al valor de la clase i-ésima.

Apliquemos estos métodos de cálculo a los datos del Cuadro 25-3, referentes al número de dientes de los peines sexuales de las patas delanteras, derecha (x) e izquierda (y) y la suma de ambas ($T = x + y$), de 20 moscas de *Drosophila*. Fijándonos, de momento, sólo en la suma de las dos patas, T, el número medio de dientes, $\bar{T}$, es:

$$\bar{T} = \frac{11 + 12 + 12 + 12 + 13 + \cdots + 15 + 16 + 16}{20}$$

$$= \frac{274}{20}$$

$$= 13.7$$

Alternativamente, empleando las frecuencias relativas de los diferentes valores medidos,

$$\bar{T} = 0.05(11) + 0.15(12) + 0.20(13) + 0.35(14) + 0.15(15) + 0.10(16) = 13.7$$

Medidas de la dispersión: la varianza

Una segunda característica de una distribución es la anchura de

CUADRO 25-3. Número de dientes en el peine sexual de la pata derecha (x) e izquierda (y), y la suma de las dos (T), de 20 individuos machos de *Drosophila*

x	y	T	n_i	$f_i = n_i/N$
6	5	11	1	$\frac{1}{20} = 0.05$
6	6	12		
5	7	12	3	$\frac{3}{20} = 0.15$
6	6	12		
7	6	13		
5	8	13	4	$\frac{4}{20} = 0.20$
6	7	13		
7	6	13		
8	6	14		
6	8	14		
7	7	14		
7	7	14	7	$\frac{7}{20} = 0.35$
7	7	14		
6	8	14		
8	6	14		
8	7	15		
7	8	15	3	$\frac{3}{20} = 0.15$
6	9	15		
8	8	16	2	$\frac{2}{20} = 0.10$
7	9	16		
$N = 20$				
$\bar{x} = 6.25$		$s_x^2 = 0.8275$		$s_x = 0.9096$
$\bar{y} = 7.05$		$s_y^2 = 1.1475$		$s_y = 1.0722$
$\bar{T} = 13.70$		$s_T^2 = 1.71$		$s_T = 1.308$
		$\text{cov}\ xy = -0.1325$		
	$r_{xy} = -0.1360$			

su dispersión en torno a la clase central. Dos distribuciones con la misma media pueden diferir mucho en el grado de concentración de los valores alrededor de la media. La medida más común de la variación en torno a la media es la **varianza**, que se define como la media del cuadrado de la desviación de las observaciones con respecto a la media, o

$$\text{Varianza} = s^2 = \frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \cdots + (x_N - \bar{x})^2}{N} = \frac{1}{N}\Sigma\,(x_i - \bar{x})^2$$

Cuando más de un individuo tiene el mismo valor medido, la varianza puede escribirse como

$$s^2 = f_1(x_1 - \bar{x})^2 + f_2(x_2 - \bar{x})^2 + \cdots + f_k(x_k - \bar{x})^2 = \Sigma\, f_i(x_i - \bar{x})^2$$

Para evitar tener que restar de la media cada valor de x por separado, podemos usar una fórmula alternativa, que es algebraicamente idéntica a la ecuación anterior:

$$s^2 = \left(\frac{1}{N}\Sigma x_i^2\right) - \bar{x}^2$$

Como la varianza se mide en unidades cuadráticas (por ejemplo, centímetros cuadrados), es habitual emplear la raíz cuadrada de la varianza, que tiene, por tanto, las mismas unidades que la propia medida. Esta medida, la raíz cuadrada de la varianza, se llama **desviación típica** de la distribución:

$$\text{desviación típica} = s = \sqrt{\text{varianza}} = \sqrt{s^2}$$

Los datos del Cuadro 25-3 pueden servir para ilustrar estos cálculos:

$$s_T^2 = \frac{(11 - 13.7)^2 + (12 - 13.7)^2 + (12 - 13.7)^2}{20} \frac{+ \cdots + (15 - 13.7)^2 + (16 - 13.7)^2}{20} = \frac{34.20}{20} = 1.71$$

Podemos emplear la fórmula computable que elimina la necesidad de usar las desviaciones individuales:

$$s_T^2 = \frac{1}{N}\Sigma\, T_i^2 - \bar{T}^2 = \frac{3788}{20} - 187.69 = 1.71$$

y

$$s = \sqrt{1.71} = 1.308$$

La Figura 25-17 muestra dos distribuciones que tienen la misma media pero diferentes desviaciones típicas (curvas A y B) y dos distribuciones que tienen la misma desviación típica pero medias diferentes (curvas A y C).

La media y la varianza de una distribución no la describen por completo. No distinguen entre una distribución simétrica y una asimétrica, por ejemplo. Podemos incluso construir distribuciones simétricas que tengan la misma media y varianza, pero que aun así tengan formas distintas. No obstante, para enfrentarnos a

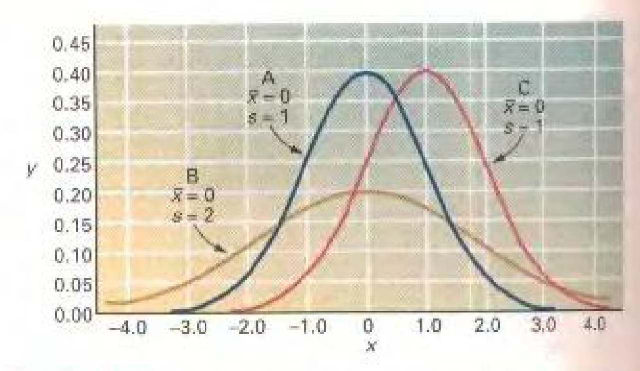


Figura 25-17. Tres funciones de distribución, dos de las cuales tienen la misma media, y otras dos la misma desviación típica.

la mayoría de los problemas de Genética cuantitativa, la media y la varianza bastan para caracterizar una distribución.

Medidas de relación

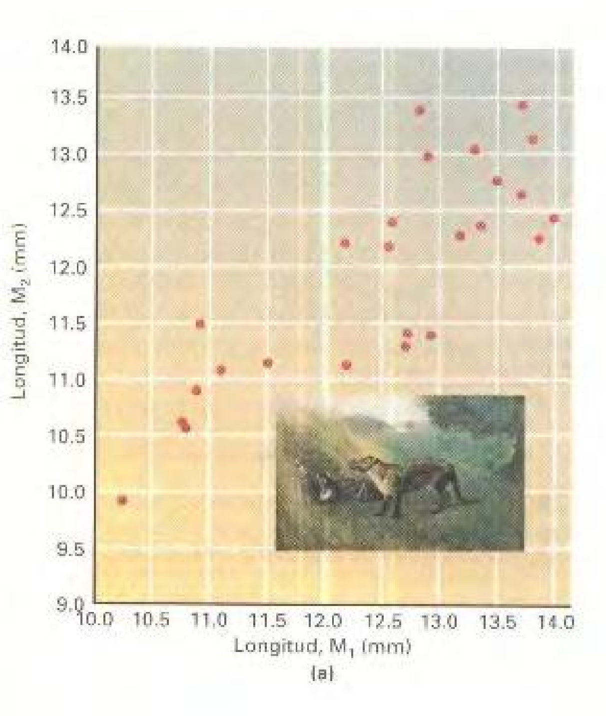
Covarianza y correlación. Otra noción estadística que es útil en los estudios de Genética cuantitativa es la asociación, o **correlación**, entre variables. Como resultado de vías complejas de causación, muchas variables, aunque de forma incompleta o aproximada, varían conjuntamente en la naturaleza. La Figura 25-18*a* ofrece un ejemplo relativo a las longitudes de dos dientes concretos de varios especímenes individuales de un mamífero fósil, *Phenacodus primaevis*. Cuanto más largo es el primer molar de un individuo, más largo es el segundo molar, aunque la relación entre las longitudes de los dos dientes es algo imprecisa. La Figura 25-18*b* muestra cómo la longitud total y la longitud de la cola de serpientes individuales (*Lampropeltis polyzona*) están estrechamente relacionadas la una con la otra.

La medida habitual de la exactitud de la relación entre dos variables x e y es el **coeficiente de correlación** (r_{xy}). Para su cálculo se obtiene primero el producto de la desviación de cada valor observado de x respecto de la media de los valores de x por la desviación de cada valor observado de y respecto de la media de los valores de y, un parámetro denominado **covarianza** de x e y (cov xy):

$$\text{cov}\ xy = \frac{(x_1 - \bar{x})(y_1 - \bar{y}) + (x_2 - \bar{x})(y_2 - \bar{y}) + \cdots}{N} \frac{+(x_N - \bar{x})(y_N - \bar{y})}{N} = \frac{1}{N}\Sigma\,(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

Una fórmula que es exactamente equivalente en términos algebraicos, pero que facilita el cálculo es

$$\text{cov}\ xy = \left(\frac{1}{N}\Sigma\, x_i y_i\right) - \bar{x}\bar{y}$$



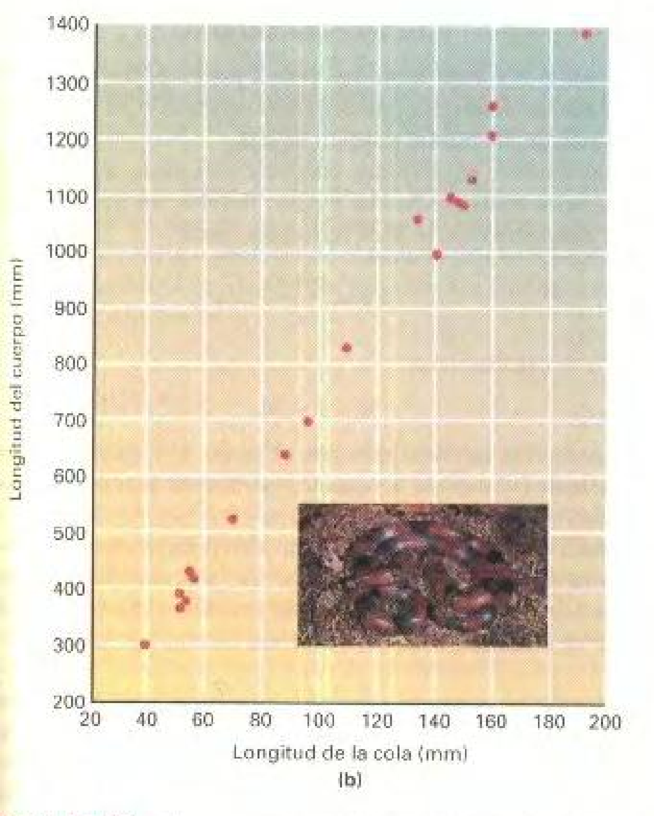


Figura 25-18. Diagramas de dispersión de las relaciones entre pares de variables. (a) Relación entre las longitudes del primer y segundo molar inferiores (M_1 y M_2) en el mamífero extinguido *Phenacodus primaevis*. Cada punto da las medidas de M_1 y M_2 de un individuo. (b) Longitud de la cola y longitud del cuerpo de 18 individuos de la serpiente *Lampropeltis polyzona*. (Imagen: Negativo n.° 2430, *Phenacodus*, pintura de Charles Knight; cortesía del Department of Library Services, American Museum of Natural History. Fotografía: Animals Animals © Zig Leszczynski.)

Utilizando esta fórmula, podemos calcular la covarianza entre los recuentos de la pata derecha (x) e izquierda (y) del Cuadro 25-3.

$$\text{cov } xy = \left(\frac{1}{N}\Sigma x_i y_i\right) - \bar{x}\bar{y}$$

$$= \frac{(6)(5) + (6)(6) + \cdots + (8)(8) + (7)(9)}{20}$$

$$-(6.65)(7.05)$$

$$= -0.1325$$

La correlación, r_{xy}, se define como

$$\text{correlación} = r_{xy} = \frac{\text{cov } xy}{s_x s_y}$$

En la fórmula de la correlación, los productos de las desviaciones se dividen por el producto de las desviaciones típicas de x e y (s_x y s_y). Esta normalización respecto de las desviaciones típicas convierte a xy en un número sin dimensiones, es decir, independiente de las unidades en que se hayan medido x e y. Así definido, xy variará desde -1, que significa una relación lineal negativa perfecta entre x e y, hasta $+1$, que indica una relación lineal positiva perfecta entre x e y. Si $xy = 0$, no existe relación lineal entre las variables. Sin embargo, es importante destacar que a veces no hay una relación *lineal* entre dos variables, pero sí hay una relación regular *no lineal* entre ellas, y una variable puede predecirse perfectamente a partir de la otra. Consideremos, por ejemplo, la parábola de la Figura 25-19. A partir de los valores de x pueden predecirse perfectamente los valores de y; sin embargo, $r_{xy} = 0$, porque en el intervalo completo de valores de x, los valores más grandes de x no están en promedio asociados con valores ni mayores ni menores de y. Los valores de r_{xy} de los datos de la Figura 25-18*a* y *b* son 0.82 y 0.99, respectivamente. En el ejemplo de los dientes del peine sexual del Cuadro 25-3, la correlación entre las patas izquierda y derecha es

$$r_{xy} = \frac{\text{cov } xy}{\sqrt{s_x^2 s_y^2}} = \frac{-0.1325}{\sqrt{(0.8275)(1.1475)}} = -0.1360$$

un valor muy pequeño.

Correlación e identidad. Es importante destacar que la correlación entre dos conjuntos de medidas no es lo mismo que la identidad numérica. Por ejemplo, dos conjuntos de valores pueden estar perfectamente *correlacionados* incluso cuando los va-

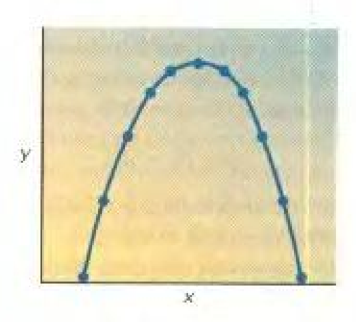


Figura 25-19. Una parábola. Puede predecirse perfectamente cada valor de y a partir del valor de x, pero no hay correlación lineal entre ambas variables.

lores de un conjunto sean mucho más altos que los valores del otro conjunto. Considere los siguientes pares de valores:

x	y
1	22
2	24
3	26

Las variables x e y en los pares anteriores están perfectamente correlacionadas ($r = +1.0$), aunque cada valor de y es unas 20 unidades mayor que el correspondiente valor de x. Dos variables están perfectamente correlacionadas si para un incremento unitario de una hay un incremento constante de la otra (o una disminución constante, si r es negativo). La importancia de la diferencia entre la correlación y la identidad aparece cuando consideramos el efecto del ambiente sobre caracteres hereditarios. Los progenitores y los descendientes pueden estar perfectamente correlacionados para un carácter como la altura y, sin embargo, a causa de una diferencia ambiental entre generaciones, cada hijo puede ser más alto que sus progenitores. Este fenómeno aparece en los estudios de adopción, en los que los hijos pueden estar correlacionados con sus progenitores biológicos, pero, en promedio, pueden ser muy diferentes de ellos, como resultado de un cambio de situación social.

Covarianza y varianza de la suma. En el Cuadro 25-3, las varianzas de las patas izquierda y derecha son 0.8275 y 1.1475, que suman 1.975, pero la varianza de la suma de las dos patas, T, es sólo 1.71. Es decir, la varianza del todo es menor que la suma de las varianzas de las partes. Esta discrepancia es una consecuencia de la correlación negativa entre los lados izquierdo y derecho. Valores más altos del lado izquierdo van asociados a valores más pequeños del lado derecho, y viceversa, así que la suma de los dos lados varía menos que cada lado por separado. Si, por el contrario, hubiera una correlación positiva entre ambos lados, entonces irían asociados valores más altos de los lados izquierdo y derecho, y la varianza de la suma de ambos lados sería mayor que la suma de las dos varianzas separadas. En general, si $x + y = T$,

$$s_T^2 = s_x^2 + s_y^2 + 2 \text{ cov } xy$$

Aplicado a los datos del Cuadro 25-3, sería

$$s_T^2 = 1.71 = 0.8275 + 1.1475 - 2(0.1325)$$

Regresión. La medida de la correlación nos proporciona únicamente una estimación de la *precisión* de la relación entre dos variables. Un problema relacionado es el de predecir el valor de una variable a partir del valor de la otra. Si x aumenta en dos unidades, ¿cuánto aumentará y? Si las dos variables están linealmente relacionadas, entonces la relación entre ellas puede expresarse como

$$y = bx + a$$

donde b es la pendiente de la recta que relaciona y con x, y a es la intersección de dicha recta con el eje y.

La Figura 25-20 muestra un diagrama de dispersión de puntos para dos variables, x e y, junto con una recta que representa la tendencia lineal general de y al aumentar x. Esta línea, denominada **recta de regresión de y sobre x**, se ha dibujado de manera que las desviaciones de los puntos respecto de la recta sean tan

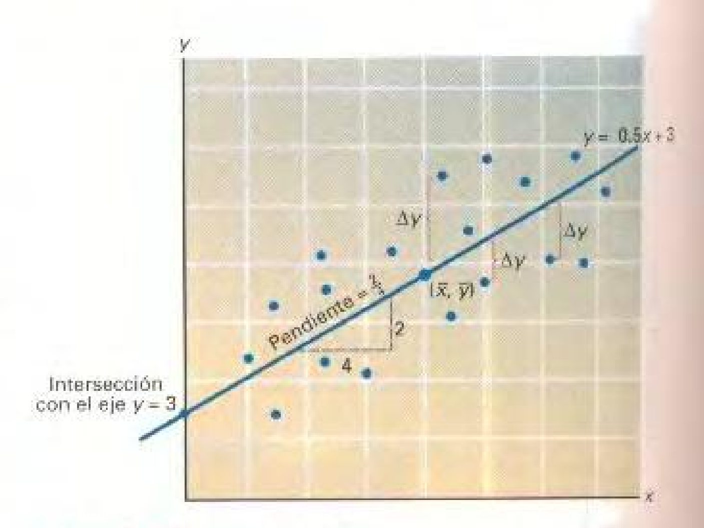


Figura 25-20. Diagrama de dispersión que muestra la relación entre dos variables, x e y, y la recta de regresión de y sobre x. Esta recta, con una pendiente de $\frac{2}{4}$, reduce al mínimo los cuadrados de las desviaciones (Δy).

pequeñas como sea posible. Específicamente, si Δy es la distancia desde un punto cualquiera hasta la recta en la dirección y, la línea se ha escogido de modo que

$$\Sigma\,(\Delta y)^2 = \text{un mínimo}$$

Cualquier otra línea recta que pase a través de los puntos del diagrama de dispersión producirá una mayor desviación cuadrática total de los puntos respecto de ella.

Obviamente, no podemos encontrar esta **recta de mínimos cuadrados** mediante prueba y error. Resulta, sin embargo, que si la pendiente b de la línea se calcula como

$$b = \frac{\text{cov } xy}{s_x^2}$$

y si a se calcula como

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

de modo que la recta pase por el punto $\bar{x}$, $\bar{y}$, entonces esos valores de b y a darán la ecuación predictiva de mínimos cuadrados.

Observe que la ecuación predictiva no permite predecir el valor exacto de y para un x dado, porque hay una dispersión en torno a la recta. La ecuación predice el *valor medio* de y para un valor de x determinado, si se tomaran muestras grandes.

Muestras y poblaciones. En los apartados anteriores se han descrito las distribuciones y algunos parámetros estadísticos de grupos particulares de individuos recolectados en algunos experimentos, o de conjuntos concretos de observaciones. Para muchos fines, sin embargo, en realidad no nos interesan concretamente los 100 estudiantes ni las 27 serpientes que se analizaron. En vez de eso, nos interesa un mundo más amplio de fenómenos, del que esos individuos particulares son tan sólo una representación. Así, podemos desear conocer el peso medio *general* de las semillas de las plantas de la especie *Crinum longifolium*. Esto es, nos interesan las características de un **universo**, del cual nuestra pequeña

colección de observaciones es sólo una **muestra**. Las características de cualquier muestra particular no son idénticas, por supuesto, a las del universo, sino que varían de una muestra a otra.

Podemos utilizar la media de una muestra para estimar la verdadera media del universo, pero la varianza y la covarianza de la muestra son en general algo más pequeñas que su valor real en el universo. Esto se debe a que las desviaciones de la media de la muestra no son independientes unas de otras, ya que los datos utilizados para calcular la media son los mismos que los utilizados para calcular las desviaciones de la media. Corregir esta desviación resulta sencillo. Siempre que nos interese la varianza de un conjunto de medidas, no como una característica de esa colección particular, sino como una estimación de un universo representado por la muestra, la expresión apropiada es $[N/(N-1)]s^2$, en vez de la propia s^2. Observe que esta nueva expresión equivale a dividir la suma de las desviaciones cuadráticas por $N - 1$, en vez de por N, como hacíamos antes. Así :

$$\left(\frac{N}{N-1}\right)s^2 = \left(\frac{N}{N-1}\right)\frac{1}{N}\Sigma(x_i - \bar{x})^2$$
$$= \frac{1}{N-1}\Sigma(x_i - x)^2$$

Todas estas consideraciones sobre el sesgo se aplican también a la covarianza de la muestra. Sin embargo, en la fórmula del coeficiente de correlación (pág. 767), el factor $N/(N-1)$ aparecería tanto en el numerador como en el denominador y, por tanto, se anulan, así que podemos ignorarlo a efectos de cálculo.

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

En algunas especies de aves cantoras, poblaciones que viven en diferentes regiones geográficas utilizan diferentes «dialectos locales» del sonido de la especie. Algunas personas creen que ello se debe a diferencias genéticas entre las poblaciones, mientras que otras creen que las diferencias de sonido se deben puramente a idiosincrasias individuales de los fundadores de esas poblaciones, que han pasado de generación en generación mediante aprendizaje. Diseñe un programa experimental que permita determinar la importancia de los factores genéticos y no genéticos, y su interacción, en la citada variación de dialectos. Si hubiera pruebas de diferencias genéticas, ¿qué experimentos podrían hacerse para obtener una descripción detallada del sistema genético, incluyendo el número de genes segregantes, sus relaciones de ligamiento, y sus efectos fenotípicos aditivos y no aditivos?

♦ Solución ♦

Se ha escogido este ejemplo porque ilustra las tremendas dificultades experimentales que se presentan cuando tratamos de determinar si las diferencias observadas en rasgos cuantitativos en algunas especies tienen una base genética. Para poder decir algo sobre los papeles de los genes y de las condiciones ambientales de desarrollo se requiere, como mínimo, que los organismos en estudio puedan ser criados a partir de óvulos fecundados en el ambiente controlado de un laboratorio. Para poder añadir consideraciones más detalladas sobre los genotipos responsables de la variación del carácter es necesario, además, que los resultados de los cruzamientos entre progenitores de fenotipo y ascendencia conocidos sean observables, y que la descendencia de algunos de esos cruzamientos sea cruzada, a su vez, con otros individuos de fenotipo y ascendencia conocidos. Muy pocas especies animales satisfacen estos requisitos, siendo mucho más fácil realizar cruzamientos controlados con plantas. Supondremos, aunque sea suponer mucho, que la especie de ave cantora en cuestión puede ser realmente criada y cruzada en cautividad.

a. Para determinar si hay alguna diferencia genética subyacente a las diferencias observadas en los dialectos de las poblaciones, necesitamos criar aves de cada población, desde el estado de huevo, en ausencia de estímulos auditivos de sus propios ancestros y en varias combinaciones de estímulos auditivos de otras poblaciones. Esto se realiza criando aves desde el estado de huevo, agrupadas como sigue:

1. Aisladas.
2. Rodeadas de polluelos derivados todos ellos de la misma población.
3. Rodeadas de polluelos derivados de otras poblaciones.
4. En presencia de adultos cantores de otras poblaciones.
5. En presencia de adultos cantores de su propia población (como control de las condiciones de cría).

Si no hay diferencias genotípicas, y todas las diferencias de dialecto son aprendidas, entonces los individuos del grupo 5 cantarán el dialecto de su población y los del grupo 4 el dialecto foráneo. Los grupos 1, 2 y 3 pueden no cantar, producir un canto general que no corresponde a ninguno de los dialectos o cantar todos el mismo dialecto, que representaría entonces el programa de desarrollo «intrínseco» no modificado por el aprendizaje.

Si las diferencias en dialecto están totalmente determinadas por diferencias genéticas, los individuos de los grupos 4 y 5 cantarán el mismo dialecto, el de sus padres. Los de los grupos 1, 2 y 3, si cantan, cada uno cantará el dialecto de su población original, independientemente de cuáles sean los miembros de su grupo. Existe finalmente la posibilidad de que los resultados sean menos claros, indicando que el carácter está influido tanto por diferencias genéticas como por el aprendizaje. Por ejemplo, las aves del grupo 4 podrían emitir un canto con elementos de ambas poblaciones. Observe que si las aves control del grupo 5 no cantaran su dialecto normal, los demás resultados serían ininterpretables, ya que las condiciones de

cría artificial estarían interfiriendo con el programa de desarrollo normal.

b. Si los resultados de los primeros experimentos muestran alguna heredabilidad en sentido amplio, entonces es posible continuar con el análisis. Éste requiere una población que segregue genéticamente, procedente de un cruce entre dos poblaciones de distinto dialecto, digamos A y B. Un cruzamiento entre machos de la población A y hembras de la población B, y el cruzamiento recíproco, dará una estimación del grado medio de dominancia de los genes que influyen en el carácter y si hay algún ligamiento al sexo. (Recuerde que en aves la hembra es el sexo heterogamético). La descendencia de este cruzamiento y de los cruzamientos subsiguientes *debe* ser criada en condiciones que no confundan el componente aprendido y el genético, como se mostró en los experimentos de la parte **a**. Este análisis genético sería imposible si no pudieran separarse los efectos del aprendizaje.

c. Para localizar los genes que influyen en las diferencias de dialecto se requeriría un gran número de marcadores genéticos segregantes. Estos pueden ser mutantes morfológicos o variantes moleculares, como polimorfismos en sitios de restricción. Las familias segregantes para las diferencias del carácter cuantitativo serían examinadas para ver si hay cosegregación de alguno de los loci marcadores con el carácter cuantitativo. De ser así, esos marcadores serían candidatos a estar ligados a loci del carácter cuantitativo. Cruzamientos adicionales entre individuos con y sin marcadores mutantes, y la medida de los valores del carácter cuantitativo en individuos de la F_2, establecerían si hay ligamiento real entre marcadores y loci del carácter cuantitativo. En la práctica, es muy improbable que tales experimentos puedan llevarse a cabo con especies de aves cantoras, debido al enorme tiempo y esfuerzo requerido para establecer líneas que lleven un gran número de distintos genes marcadores y polimorfismos moleculares.

PROBLEMAS RESUELTOS

1. Se cruzan dos líneas endogámicas de judías. En la F_1, la varianza del peso de las judías resulta ser 1.5. Se autofecunda la F_1; en la F_2, la varianza del peso de las judías es 6.1. Estime la heredabilidad en sentido amplio del peso de las judías en este experimento.

♦ Solución ♦

La clave aquí está en reconocer que toda la varianza de la población F_1 debe ser ambiental, ya que todos los individuos deben ser del mismo genotipo. Además, la varianza de la F_2 debe ser una combinación de componentes genéticos y ambientales, porque todos los genes en heterocigosis en la F_1 segregarán en la F_2 para dar una serie de genotipos diferentes relacionados con el peso de las judías. De ahí que podamos estimar

$$s_e^2 = 1.5$$
$$s_e^2 + s_g^2 = 6.1$$

Por tanto

$$s_g^2 = 6.1 - 1.5 = 4.6$$

y la heredabilidad en sentido amplio es

$$H^2 = \frac{4.6}{6.1} = 0.75\ (75\ \%)$$

2. En una población experimental de *Tribolium* (el escarabajo de la harina), la longitud corporal muestra una distribución continua, con una media de 6 mm. Se sacan y se cruzan entre sí un grupo de machos y hembras de 9 mm de longitud. La media de las longitudes corporales de sus descendientes es de 7.2 mm. A partir de estos datos, calcule la heredabilidad en sentido estricto de la longitud corporal en esta población.

♦ Solución ♦

El diferencial de selección es 9 − 6 = 3 mm, y el progreso de selección es 7.2 − 6 = 1.2 mm. Por tanto, la heredabilidad en sentido estricto es

$$h^2 = \frac{1.2}{3} = 0.4\ (40\ \%)$$

PROBLEMAS

1. Distinga entre variación continua y discontinua de una población, y ofrezca algunos ejemplos de cada una de ellas.

2. En un rebaño grande de vacuno, se miden tres caracteres distintos que muestran una distribución continua, y se calculan las varianzas que aparecen en la tabla siguiente:

	CARACTERES		
Varianza	Longitud de la pata	Longitud del cuello	Contenido en grasa
Fenotípica	310.2	730.4	106.0
Ambiental	248.1	292.2	53.0
Genética aditiva	46.5	73.0	42.4
Genética debida a dominancia	15.6	365.2	10.6

a. Calcule las heredabilidades en sentido amplio y estricto de cada carácter.

b. En la población de animales estudiada, ¿qué carácter respondería mejor a la selección? ¿Por qué?

c. Se emprende un proyecto para hacer disminuir el contenido medio de grasa del rebaño. El contenido medio de grasa es inicialmente del 10.5 %. Como progenitores de la siguiente generación se cruzan entre sí animales con un contenido de grasa del 6.5 %. ¿Qué contenido medio de grasa se espera en los descendientes de esos progenitores?

3. Supongamos que se cruzan dos heterocigotos triples, *A/a* ; *B/b* ; *C/c*. Suponga que los tres loci están en cromosomas distintos.

a. ¿Qué proporciones de la descendencia son homocigotas en uno, dos y tres loci, respectivamente?

b. ¿Qué proporciones de la descendencia llevan, respectivamente, 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 alelos de los representados por letras mayúsculas?

4. En el problema 3, suponga que los efectos fenotípicos medios de los tres genotipos del locus *A* son $A/A = 4$, $A/a = 3$, y $a/a = 1$, y que los efectos de los loci *B* y *C* son iguales al anterior. Suponga también que los efectos de los loci son aditivos. Calcule y dibuje la distribución de fenotipos de la población (suponiendo que no hay varianza ambiental).

5. Supongamos que en el problema 4 hay un umbral en el carácter fenotípico, de modo que cuando el valor fenotípico está por encima de 9, una mosca *Drosophila* individual tiene tres cerdas; cuando está entre 5 y 9, tiene dos cerdas; y cuando el valor es 4 o menos, tiene 1 cerda. Describa el resultado de cruzamientos dentro de cada clase y entre ellas. Conociendo el resultado, ¿podría inferir la situación genética subyacente?

6. Supongamos que la forma general de la distribución de un rasgo para un genotipo dado es

$$f = 1 - \frac{(x - \bar{x})^2}{s_e^2}$$

en el intervalo de *x* donde *f* es positiva.

a. En la misma escala, represente las distribuciones de tres genotipos con las siguientes medias y varianzas ambientales:

Genotipo	$\bar{x}$	s_e^2	Intervalo aproximado del fenotipo
1	0.20	0.3	$x = 0.03$ a $x = 0.37$
2	0.22	0.1	$x = 0.12$ a $x = 0.24$
3	0.24	0.2	$x = 0.10$ a $x = 0.38$

b. Represente la distribución fenotípica que resultaría si los tres genotipos aparecieran con la misma frecuencia en una población. ¿Pueden observarse modas distintas? En su caso, ¿cuáles son?

7. La tabla siguiente muestra una distribución del número de cerdas de *Drosophila*:

Número de cerdas	Número de individuos
1	1
2	4
3	7
4	31
5	56
6	17
7	4

Calcule la media, la varianza y la desviación típica de esta distribución.

8. Los conjuntos siguientes de datos hipotéticos representan pares de observaciones de dos variables (*x*, *y*). Represente cada conjunto de pares de datos en un diagrama de dispersión. Observe los puntos representados y haga una conjetura intuitiva sobre la correlación entre *x* e *y*. Calcule entonces el coeficiente de correlación para cada conjunto de pares de datos y compare ese valor con su estimación.

a. (1,1); (2,2); (3,3); (4,4); (5,5); (6,6).

b. (1,2); (2,1); (3,4); (4,3); (5,6); (6,5).

c. (1,3); (2,1); (3,2); (4,6); (5,4); (6,5).

d. (1,5); (2,3); (3,1); (4,6); (5,4); (6,2).

9. Un libro sobre el problema de la heredabilidad del CI hace las tres afirmaciones siguientes. Discuta la validez de cada afirmación y sus implicaciones sobre la comprensión de los autores del significado de h^2 y H^2.

a. «Entonces, la cuestión interesante es... ¿Cómo de hereditario? La respuesta (0.01) tiene una aplicación teórica y práctica muy diferente de la respuesta (0.99)». (Los autores están hablando de H^2).

b. «Como regla práctica, cuando se discute sobre educación, H^2 es habitualmente el coeficiente de mayor relevancia, y cuando se discute de eugenesia y disgenesia (reproducción de individuos seleccionados), normalmente lo indicado es emplear h^2».

c. «Pero que los diferentes patrones de capacidades deriven o no de diferencias en los genes... no es relevante para valorar la discriminación en el empleo. Para lo que podría ser relevante es para decidir qué podría hacerse, a largo plazo, para cambiar la situación.»

(De J. C. Loehlin, G. Lindzey y J. N. Spuhler, *Race Differences in Intelligence*. Copyright © 1975 de W. H. Freeman and Company.)

10. Empleando los conceptos de norma de reacción, distribución ambiental, distribución genotípica y distribución fenotípica, trate de rehacer la siguiente afirmación en términos más exactos: «El 80 % de la diferencia en el rendimiento del CI entre dos grupos es genético». ¿Qué significado tendría hablar de la heredabilidad de una diferencia entre grupos?

11. Describa un protocolo experimental basado en estudios de parientes que pueda estimar la heredabilidad en sentido amplio del alcoholismo. Recuerde que debe hacer una definición operativa adecuada del propio rasgo.

12. Una línea de *Drosophila* seleccionada para un número alto de cerdas tiene una media de 25 cerdas esternopleurales, mientras que una línea seleccionada para un número bajo tiene una media de sólo 2. Se utilizan estirpes marcadas en los dos autosomas grandes II y III para crear estirpes con varias combinaciones de cromosomas de las líneas alta (h)

y baja (l). El número medio de cerdas para cada combinación cromosómica es como sigue:

$\frac{h\ h}{h\ h}$ 25.1	$\frac{h\ h}{l\ h}$ 22.2	$\frac{l\ h}{l\ h}$ 19.0
$\frac{h\ h}{h\ l}$ 23.0	$\frac{h\ h}{l\ l}$ 19.9	$\frac{l\ h}{l\ l}$ 14.7
$\frac{h\ l}{h\ l}$ 11.8	$\frac{h\ l}{l\ l}$ 9.1	$\frac{l\ l}{l\ l}$ 2.3

¿Qué conclusiones puede extraer de estos datos sobre la distribución de factores genéticos y sus acciones?

13. Supongamos que se mide el número de facetas oculares en una población de *Drosophila* criada a varias temperaturas. Supongamos además que es posible calcular la varianza genética total s_g^2 así como la distribución fenotípica. Finalmente, supongamos que sólo hay dos genotipos en la población. Dibuje pares de normas de reacción que conducirían a los siguientes resultados:

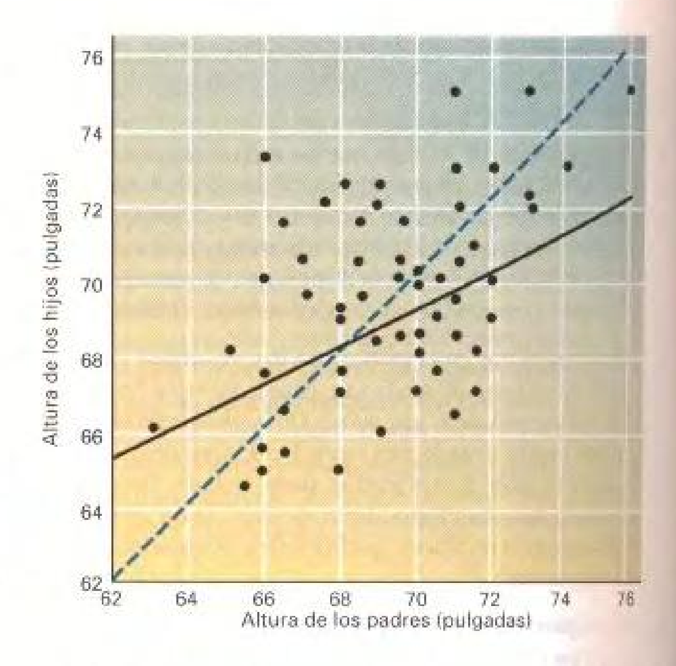
a. Un aumento de la temperatura media hace disminuir la varianza fenotípica.

b. Un aumento de la temperatura media hace que se incremente H^2.

c. Un aumento de la temperatura media hace que se incremente s_g^2 pero que disminuya H^2.

d. Un aumento de la *varianza* de las temperaturas transforma una distribución fenotípica unimodal en una bimodal (una norma de reacción es aquí suficiente).

14. Francis Galton comparó las alturas de estudiantes varones con las de sus padres, con los resultados que se muestran en el gráfico.



La altura media de todos los padres es igual a la altura media de todos los hijos, pero las clases individuales de alturas no son iguales en las dos generaciones. Los padres muy altos tienen hijos algo más bajos, mientras que los padres muy bajos tienen hijos algo más altos. Como resultado, la mejor recta que puede trazarse a través de los puntos del diagrama de dispersión tiene una pendiente de alrededor de 0.67 (*recta continua*) en vez de 1 (*recta discontinua*). Galton empleó el término *regresión* para describir esta tendencia a que el fenotipo de los hijos esté más próximo a la media de la población que el de sus padres.

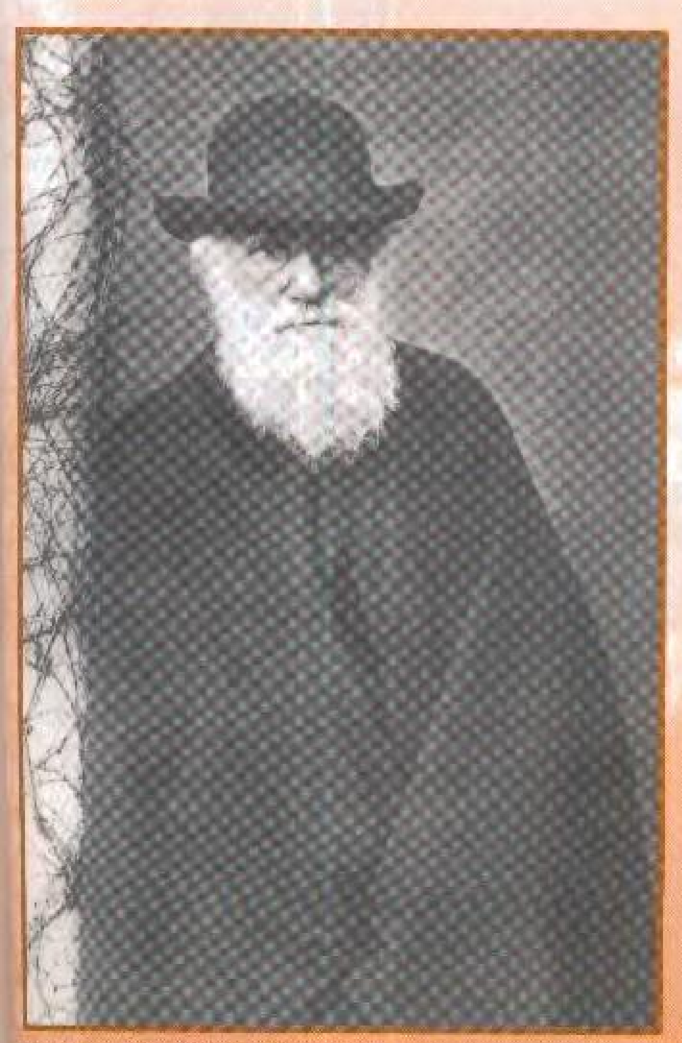
a. Proponga una explicación para esta regresión.

b. ¿Cómo se relacionan aquí regresión y heredabilidad?

(Gráfico, según W. F. Bodmer y L. L. Cavalli-Sforza, *Genetics, Evolution and Man*. Copyright © 1976, de W. H. Freeman and Company.)

26

GENÉTICA EVOLUTIVA



Charles Darwin. (Corbis/Bettmann.)

Ideas fundamentales

La evolución consiste en cambios heredables continuos en los organismos dentro de una línea única de sucesión (evolución filética) y la diferenciación entre las distintas líneas de sucesión para formar especies distintas (diversificación).

Los mecanismos de la evolución darwiniana se apoyan en tres principios básicos: (1) los organismos pertenecientes a una misma especie difieren entre sí, (2) la variación es heredable, y (3) los distintos tipos producen cantidades diferentes de descendientes para las generaciones futuras.

Tanto el cambio filético como la diversificación son el resultado de la interacción entre las fuerzas direccionales de la selección natural y el azar.

La selección natural es la reproducción diferencial de los distintos genotipos como consecuencia de las diferencias en sus rasgos fisiológicos, morfológicos y de comportamiento.

Los efectos del azar incluyen el muestreo de los gametos en cada generación en las poblaciones finitas y la aparición aleatoria de mutaciones.

Una consecuencia de los efectos del azar en la evolución es que las propias fuerzas de la selección natural no conducen al mismo resultado evolutivo en líneas de descendencia independientes.

Las especies son poblaciones de organismos aisladas reproductivamente que pueden intercambiar genes dentro del grupo pero no con otras especies, ya que los grupos son incompatibles por razones fisiológicas, de comportamiento o de desarrollo.

Las novedades evolutivas son posibles porque el DNA nuevo se adquiere tanto por la duplicación y posterior diferenciación del DNA ya presente en la especie, como por la introducción de nuevo DNA procedente de otras especies.

La teoría moderna de la evolución se identifica tanto con el nombre de Charles Darwin (1809-1882) que mucha gente piensa que el concepto de la evolución de los organismos fue propuesto por primera vez por Darwin, pero desde luego no fue así. La mayoría de los científicos habían abandonado la noción de las especies fijas (sin cambios desde su origen en el momento de la creación) mucho antes de la publicación, en 1859, del libro de Darwin *El origen de las especies*. En ese momento, la mayoría de los biólogos estaban de acuerdo en que las nuevas especies surgían por algún proceso de evolución a partir de especies preexistentes; el problema era explicar *cómo* podía ocurrir esta evolución.

La teoría de Darwin del mecanismo de la evolución comienza con la variación que existe entre los organismos de una misma especie. Los individuos de una generación son cualitativamente distintos unos de otros. La evolución de las especies en general surge de las diferentes tasas de supervivencia y reproducción de los diversos tipos, por lo que las frecuencias relativas de estos distintos tipos cambian a lo largo del tiempo. La evolución es, desde este punto de vista, un proceso de clasificación competitiva.

Para Darwin, la evolución del grupo surgía de la supervivencia y reproducción diferencial de las variantes individuales *ya existentes* en el grupo, variantes que surgen independientemente del medio ambiente pero cuya supervivencia y reproducción sí dependen del medio ambiente.

COROLARIO

Darwin propuso una nueva explicación sobre el fenómeno aceptado de la evolución. Argumentó que la población de una especie en un momento determinado incluye individuos con características que varían de unos a otros. La población de la siguiente generación presentará una frecuencia mayor de aquellos tipos que sobreviven y se reproducen con más éxito bajo las condiciones ambientales existentes. Así, dentro de la especie, las frecuencias de los distintos tipos cambiarán con el tiempo.

Hay una similitud evidente entre el proceso de la evolución, tal como lo describió Darwin, y el proceso mediante el cual los criadores mejoran los animales domésticos y las plantas cultivadas. Un agricultor selecciona las plantas de la población con más alto rendimiento y (en la medida de lo posible) las utiliza como progenitoras de la siguiente generación. Si son heredables las características que originan un rendimiento superior, entonces la siguiente generación producirá un rendimiento más alto. No fue accidental que Darwin eligiera el término **selección natural** para describir su modelo de evolución mediante las distintas tasas de reproducción de las diferentes variantes de la población. Al concebir su modelo evolutivo, Darwin se inspiró en la selección que los criadores ejercían sobre las sucesivas generaciones de animales y plantas domesticados.

Podemos resumir la teoría de la evolución por selección natural de Darwin en tres principios fundamentales:

1. **Principio de variación.** Entre los individuos de una población, existe variación en la morfología, la fisiología y el comportamiento.
2. **Principio de herencia.** Los descendientes se parecen más a sus progenitores que a otros individuos no emparentados.
3. **Principio de selección.** En un mismo medio ambiente, algunas formas obtienen mayor éxito que otras, tanto en la supervivencia como en la reproducción.

Desde luego, un proceso selectivo sólo puede producir cambios en la composición de la población si sus individuos muestran alguna variación sobre la que ejercer la selección. Si todos los individuos son idénticos, ninguna diferencia en la tasa de reproducción entre ellos puede alterar la composición de la población. Es más, la variación debe ser heredable, al menos en parte, para que la reproducción diferencial altere la composición genética de la población. Si, por ejemplo, los animales más gran-

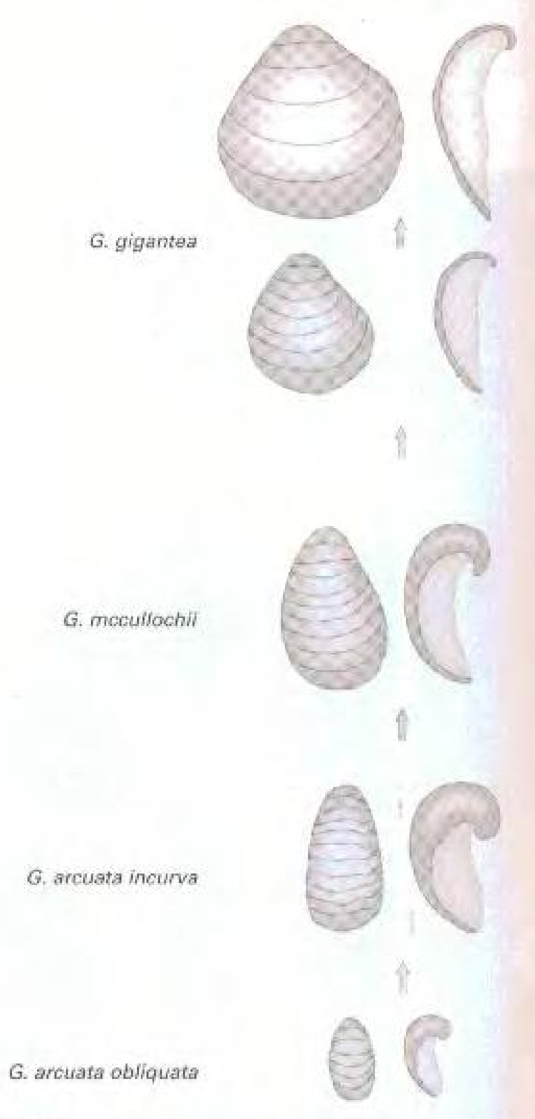


Figura 26-1. Cambios en el tamaño y la curvatura del caparazón del molusco bivalvo *Gryphaea* a lo largo de su evolución filética en el Jurásico temprano. Sólo se muestra la valva izquierda. En cada caso, se ilustra tanto una visión trasera como una sección longitudinal (Modificado de A. Hallam, «Morphology, Paleoecology and Evolution of the Genus Gryphaea in the British Lias», *Philosophical Transactions Of the Royal Society of London, Series B*, 254, 1968, 124.)

des de una población tienen más descendientes que los de menor tamaño, pero estos descendientes no son como promedio mayores que los descendientes de animales pequeños, entonces no se producirá ningún cambio en la composición genética de la población de una generación a otra. Por último, si todos los tipos de variantes producen, por término medio, el mismo número de descendientes, podríamos esperar que la población permaneciera constante.

COROLARIO

Se deben cumplir los principios darwinianos de variación, herencia y selección para que haya evolución mediante un mecanismo basado en la existencia de variación.

La explicación darwiniana de la evolución se debe aplicar a dos aspectos fundamentales de la historia de la vida en nuestro planeta. Uno de ellos es el cambio sucesivo de forma y función que se produce en una misma línea continua de descendencia en el tiempo, la **evolución filética**. La Figura 26-1 muestra ese tipo de cambio constante en el tamaño y la curvatura de la valva izquierda de la ostra *Gryphaea* en los últimos 40 millones de años. El otro aspecto es la **diversificación** que ocurre entre las especies a lo largo de la historia de la vida en la Tierra, generando muchas especies contemporáneas distintas que presentan morfologías y formas de vida completamente diferentes. En la Figura 26-2 se observa parte de la variedad de formas de moluscos bivalvos que han existido en diferentes momentos en los últimos 130 millones de años. Cada especie se extingue en un momento dado y, de hecho, se han extinguido más del 99.9 % de todas las especies que han existido. Aún así, el número de especies y la diversidad de formas y funciones se ha venido incrementando en los últimos mil millones de años. Es decir, las especies no sólo deben cambiar, sino que deben dar lugar a nuevas especies distintas en el curso de la evolución. Ambos procesos son consecuencia de la herencia de la variación en las poblaciones de organismos. La variación heredable suministra la materia prima para los continuos cambios dentro de una misma especie y para la multiplicación de nuevas especies. Los mecanismos básicos de tales cambios (comentados en el Cap. 24) son el origen de la nueva variación por medio de diversas categorías de mutaciones, modificaciones en las frecuencias alélicas mediante procesos selectivos y aleatorios, divergencia de poblaciones locales aisladas por causas selectivas distintas o debido a la deriva aleatoria, así como por la reducción de la variación entre poblaciones debido a la migración. De estos mecanismos básicos, la Genética de poblaciones, como se mostró en el Capítulo 24, deriva una serie de principios que rigen los cambios en la composición genética de las poblaciones. La aplicación de estos principios de la Genética de poblaciones proporciona una teoría articulada de la evolución.

COROLARIO

En el concepto darwiniano, la evolución es la conversión, mediante los mecanismos de la Genética de poblaciones, de la variación heredable entre los individuos de una población en diferencias heredables entre poblaciones en el tiempo y en el espacio.

Una síntesis de fuerzas: variación y divergencia de las poblaciones

En la evolución, las diversas fuerzas que conforman la estructura de las poblaciones, la mutación, la migración y la selección, se hallan todas actuando simultáneamente. Tenemos que considerar cómo estas fuerzas, actuando a la vez, moldean la composi-

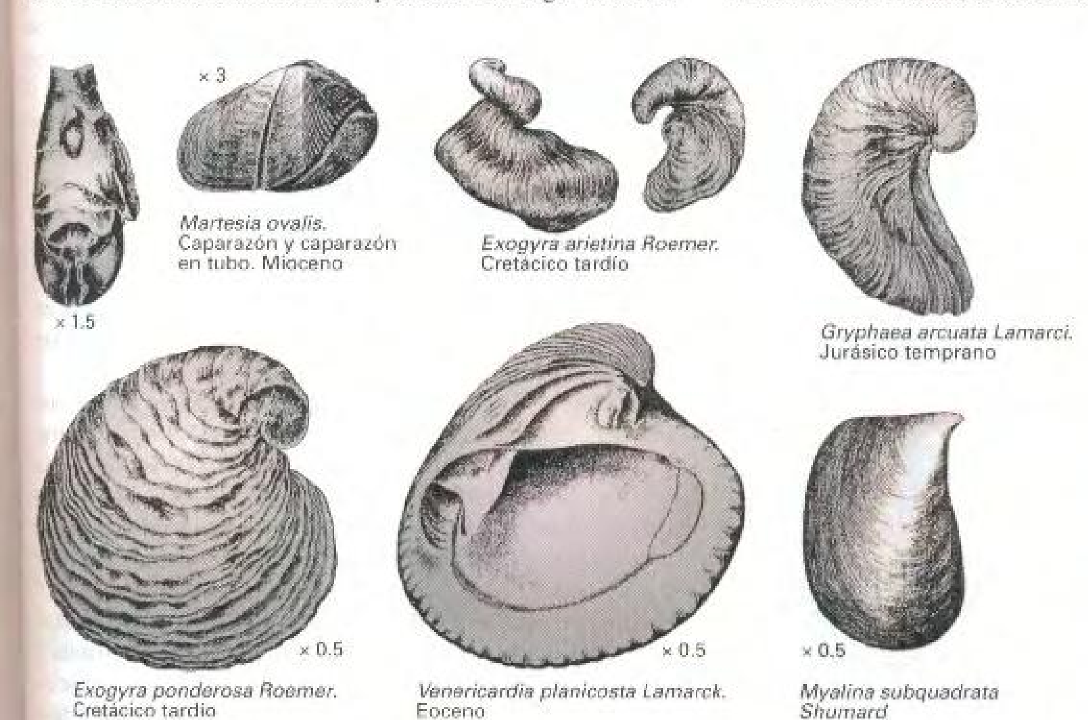


Figura 26-2. Variedad de caparazones de moluscos bivalvos que han aparecido en los últimos 300 millones de años de evolución (Modificado de C. L. Fenton y M. A. Fenton, *The Fossil Book*, Doubleday, 1958.)

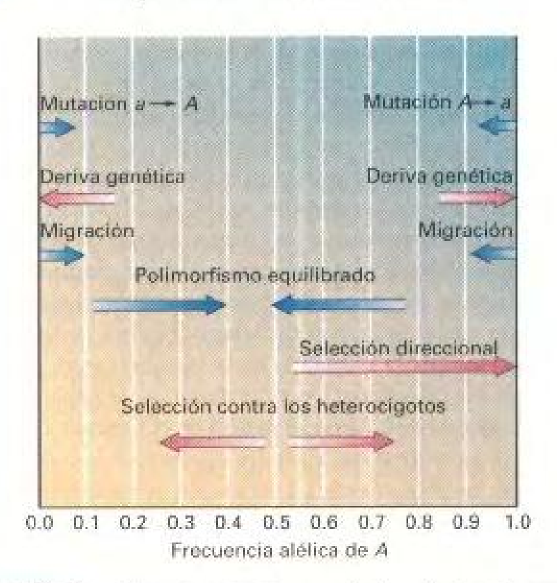


Figura 26-3. Efectos de varias fuerzas evolutivas sobre las frecuencias alélicas. Las flechas azules muestran una tendencia hacia un incremento de la variación en la población; las flechas rojas, hacia la disminución de la variación.

ción genética de las poblaciones para generar tanto la variación en el seno de las poblaciones locales como las diferencias entre ellas.

La variación genética en una población y entre las poblaciones es el resultado de la interacción de las distintas fuerzas evolutivas (Fig. 26-3). Como muestra el Cuadro 26-1, generalmente, las fuerzas que aumentan o mantienen la variación en el seno de las poblaciones evitan la diferenciación entre sí de las distintas poblaciones, mientras que la divergencia entre poblaciones es la consecuencia de las fuerzas que aumentan la homocigosis en cada población. Así, la deriva genética aleatoria (o la endogamia) produce homocigosidad a la vez que causa la divergencia entre distintas poblaciones. Esta divergencia y la homocigosidad son contrarrestadas por el suministro constante que supone la mutación y la migración entre poblaciones locales, introduciendo de nuevo variación dentro de una población dada, tendiendo a hacerla más parecida a las otras.

Cuando Darwin llegó a las Islas Galápagos en 1835 encontró una notable variedad de pájaros pinzones que supusieron un caso muy atractivo y sugerente para el desarrollo de su teoría de la evolución. El archipiélago de las Islas Galápagos es un conjunto de 29 islas e islotes de diferente tamaño, a 600 millas de la costa de Ecuador. En la Figura 26-4 se exponen las 13 especies de pinzón de Las Galápagos. Los pinzones se alimentan habitualmente de semillas en el suelo, y poseen picos gruesos para romper las duras cubiertas de algunas semillas. Las especies de Las Galápagos, aunque pinzones todos ellos, muestran una inmensa variación en su forma de vida, la forma de sus picos y su conducta, bajo las cuales subyacen importantes diferencias ecológicas. Por ejemplo, el pinzón vegetariano arborícola se alimenta de frutos y hojas, el pinzón insectívoro presenta un pico con una punta cortante para comer insectos de gran tamaño y el pinzón carpintero, el más llamativo de todos, sujeta una ramita con su pico y la utiliza para obtener sus presas, también insectos, inspeccionando los orificios de los árboles. Esta diversidad de especies surgió a partir de una población original de comedores de semillas que llegó a Las Galápagos procedentes del continente americano. Los descendientes de los colonizadores iniciales se distribuyeron por las distintas islas y en zonas diferentes en las islas más grandes, formando poblaciones locales que fueron diferenciándose unas de otras y creando ocasionalmente especies distintas.

Consideremos la situación de un locus genéticamente variable en un conjunto de poblaciones incomunicadas en las distintas islas, y que todas esas poblaciones se fundaron a partir de un conjunto inicial de inmigrantes que constituía la población original. Los fundadores originales de cada población son, a su vez, pequeñas muestras de la población donante y, por consiguiente, difieren entre sí en las frecuencias alélicas a causa de un efecto de muestreo al azar. Esta variación inicial es lo que se llama **efecto fundador**. En las generaciones sucesivas, como resultado de la deriva genética aleatoria en cada población, hay un cambio adicional en la frecuencia alélica, p_i, de cada uno de los i alelos hacia 1 ó 0, pero la frecuencia alélica media de todas las poblaciones en su conjunto permanece como p_i. En la Figura 26-5 se muestra la distribución de frecuencias alélicas entre las islas en generaciones sucesivas, donde $p(A_1) = 0.5$. En la generación 0 todas las poblaciones son idénticas. A medida que el tiempo pasa, las frecuencias alélicas divergen entre las distintas poblaciones y algunas de ellas quedan fijadas. Tras unas $2N$ generaciones, cada frecuencia alélica es igualmente probable, salvo aquellas que han quedado fijadas ($p = 0$ y $p = 1$), y alrededor de la mitad de las poblaciones son totalmente homocigóticas. Una vez transcurridas $4N$ generaciones, el 80 % de las poblaciones se encuentran fijadas, siendo la mitad homocigóticas *A/A* y la otra mitad *a/a*.

El proceso de diferenciación por endogamia en poblaciones insulares es lento, pero no en una escala geológica o evolutiva. Si una isla puede sostener, digamos que 10 000 individuos de una especie de roedores, entonces tras 20 000 generaciones (alrededor de 7000 años, suponiendo unas tres generaciones por año), la población será homocigótica para aproximadamente la mitad de todos los loci que inicialmente se encontraban en el máximo de heterocigosidad. Más aún, la isla se diferenciará de otras islas similares en dos facetas. Los loci que están fijados se encontrarán todavía segregando en otras islas, y otros loci se encontrarán fijados para otro alelo. Para los loci que estén todavía

CUADRO 26-1. Las fuerzas de la evolución provocan un aumento (+) o una disminución (−) de la variación en la población y entre poblaciones

Fuerza	Variación en la población	Variación entre las poblaciones
Endogamia o deriva genética	−	+
Mutación	+	−
Migración	+	−
Selección		
Direccional	−	+/−
Equilibrada	+	−
Incompatible	−	+

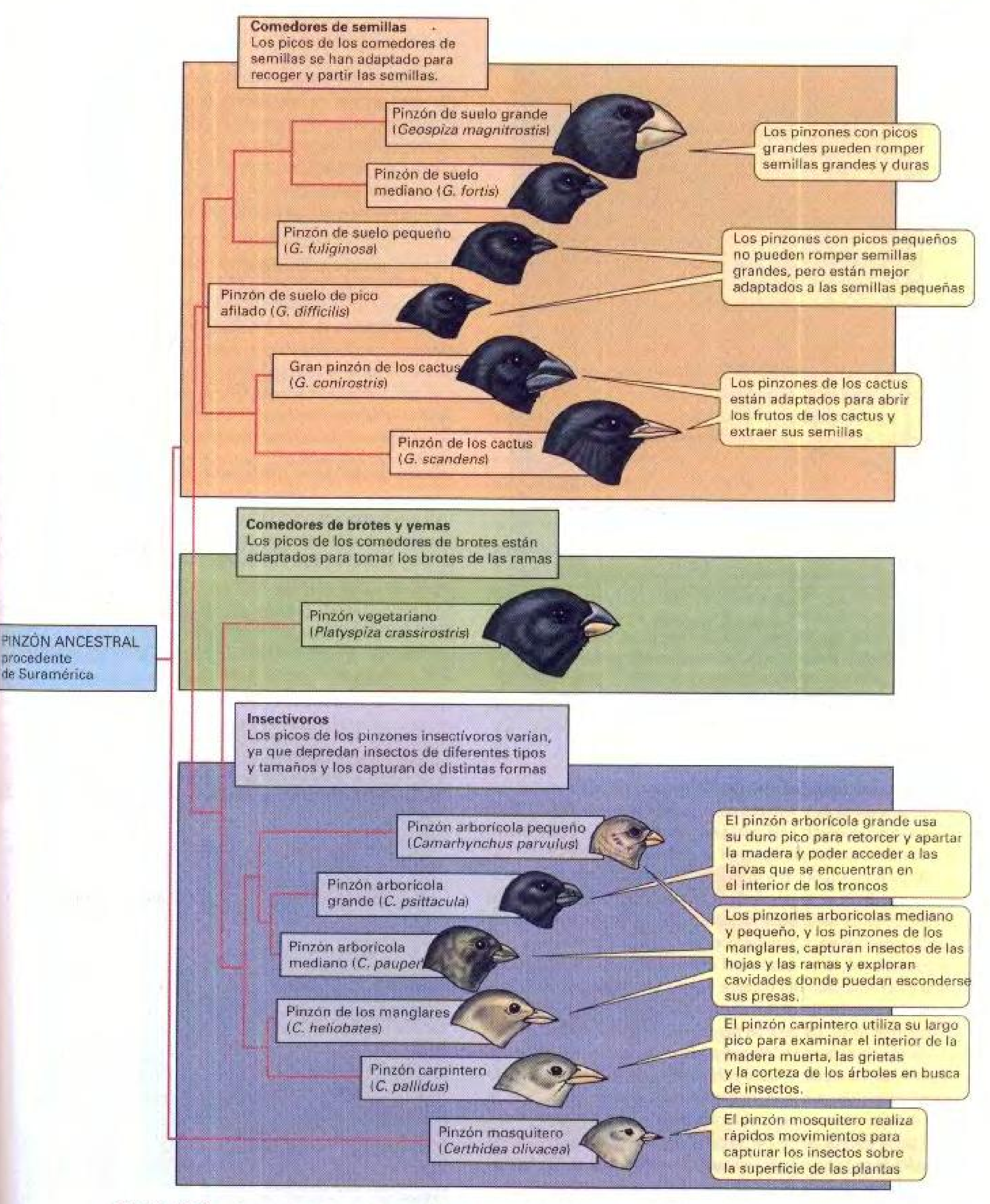


Figura 26-4. Las trece especies de pinzones encontradas en las Islas Galápagos (De W. K. Purves, G. H. Orians y H. C. Heller, *Life*: *The Science of Biology*, 4th ed. New York, Sinauer Associates/W. H. Freeman, 1995, Fig. 20.3, pág. 450.)

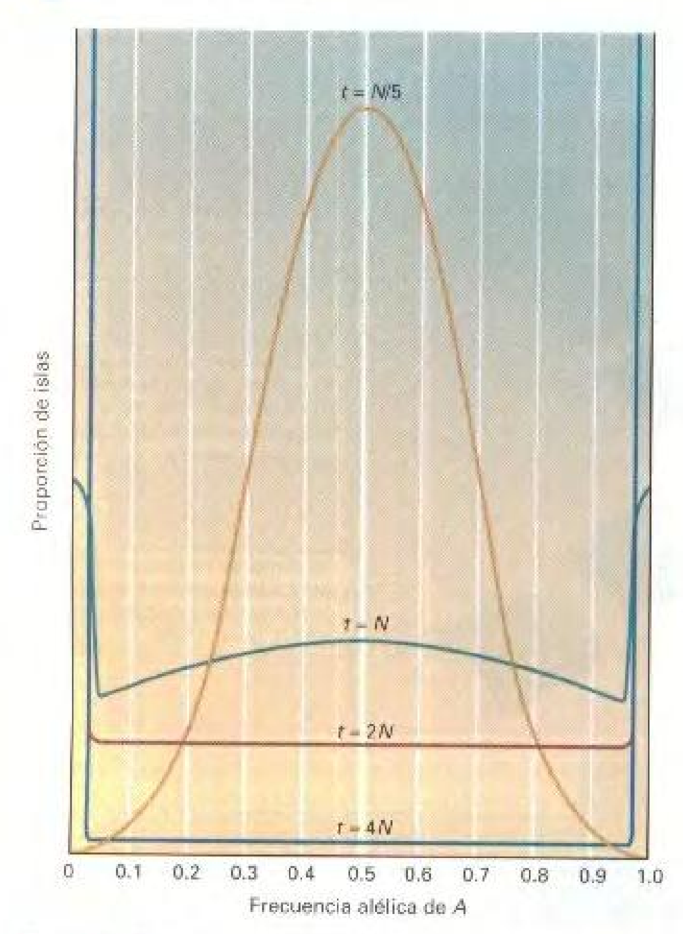


Figura 26-5. Distribución de las frecuencias alélicas en poblaciones isleñas tras varios números de generaciones de aislamiento, donde el número de generaciones transcurridas (t) se representa como múltiplos del tamaño de la población (N).

segregando en todas las islas habrá una gran variación en las frecuencias alélicas de isla a isla, como se muestra en la Figura 26-5.

Cualquier población de cualquier especie es de tamaño finito, por lo que todas las poblaciones se podrían convertir ocasionalmente en homocigóticas y diferenciarse unas de otras como consecuencia de la endogamia. Entonces cesaría la evolución. Sin embargo, en la naturaleza siempre se está introduciendo en las poblaciones nueva variación por medio de las mutaciones y la migración. Así, la variación real disponible para la selección natural es el resultado del balance entre la introducción de nueva variación por medio de las causas anteriores y su pérdida por endogamia local. La tasa de pérdida de heterocigosidad en una población cerrada es $1/(2N)$ por generación, por lo que cualquier diferenciación efectiva entre poblaciones se verá impedida si la nueva variación se introduce con esa tasa o superior. Si m es la tasa de migración en una población dada y μ es la tasa de mutación hacia nuevos alelos por generación, entonces una población retendrá la mayor parte de su heterocigosidad y no se diferenciará mucho de otras poblaciones por endogamia local si

$$m \geq \frac{1}{N} \quad \text{o} \quad \mu \geq \frac{1}{N}$$

o si

$$Nm \geq 1 \quad \text{ó} \quad N\mu \geq 1$$

En las poblaciones de tamaño intermedio o incluso moderadamente grande, es improbable que $N\mu \geq 1$. Por ejemplo, si el tamaño de la población es de 100 000, entonces la tasa de mutación debe ser superior a 10^{-5}, que es un valor que se encuentra en la parte alta de la escala de valores conocidos para tasas de mutación, pero no es imposible. A su vez, una tasa de migración de 10^{-5} por generación no es una cifra irrealmente grande. De hecho

$$m = \frac{\text{numero de inmigrantes}}{\text{tamaño de la población}} = \frac{\text{número de inmigrantes}}{N}$$

Así, el requisito de que $Nm \geq 1$ es equivalente al requisito de que

$$Nm = N \times \frac{\text{Número de inmigrantes}}{N} \geq 1$$

o que

$$\text{número de individuos inmigrantes} \geq 1$$

independientemente del tamaño de la población. En muchas poblaciones, que migren más de un único individuo por generación es muy probable. Las poblaciones humanas (incluso las poblaciones de tribus aisladas) tienen una tasa de migración superior a este valor mínimo y, como consecuencia, no se conoce ningún locus humano para el que un alelo se encuentre fijado en algunas poblaciones, mientras que otro alelo alternativo se encuentre fijado en otras poblaciones (Cuadro 26-2).

CUADRO 26-2. Ejemplos de diferenciación extrema y alto grado de similitud en las frecuencias alélicas de los grupos sanguíneos en tres grupos raciales

		POBLACIÓN		
Gen	Alelo	Caucasoide	Negroide	Mongoloide
Duffy	F_y	0.0300	0.9393	0.0985
	F_y^a	0.4208	0.0000	0.9015
	F_y^b	0.5492	0.0607	0.0000
Rhesus	R_0	0.0186	0.7395	0.0409
	R_1	0.4036	0.0256	0.7591
	R_2	0.1670	0.0427	0.1951
	r	0.3820	0.1184	0.0049
	r'	0.0049	0.0707	0.0000
	Otros	0.0239	0.0021	0.0000
P	P_1	0.5161	0.8911	0.1677
	P_2	0.4839	0.1089	0.8323
Auberger	Au^a	0.6213	0.6419	Sin datos
	Au	0.3787	0.3581	Sin datos
Xg	Xg^a	0.67	0.55	0.54
	Xg	0.33	0.45	0.46
Secretor	Se	0.5233	0.5727	Sin datos
	se	0.4767	0.4273	Sin datos

Fuente: aparece un resumen en L. L. Cavalli-Sforza y W. F. Bodmer, *The Genetics of Human Populations* (W. H. Freeman and Company, 1971), págs. 724-725. Véase para datos más en detalle L. L. Cavalli-Sforza, P. Menozzi y A. Piazza, *The History and Geography of Human Genes* (Princeton University Press, 1944.)

Los efectos de la selección son más variables. La **selección direccional** dirige a una población hacia la homocigosidad, rechazando la mayoría de las nuevas mutaciones a medida que se introducen en la población pero, ocasionalmente (si la mutación presenta alguna ventaja), actúa favoreciendo la expansión del alelo en la dirección de la creación de un nuevo estado de homocigosis. Que esta selección direccional promueva la diferenciación entre poblaciones depende del medio ambiente y de sucesos aleatorios. Dos poblaciones que viven en ambientes muy similares pueden mantenerse muy similares genéticamente por la acción de la selección direccional pero, si hay diferencias ambientales, la selección puede dirigir a las poblaciones hacia constituciones genéticas distintas.

La selección que favorece a los heterocigotos (selección equilibrada) mantendrá, en su mayor parte, niveles de polimorfismo más o menos similares en distintas poblaciones. Pero de nuevo, si los ambientes son suficientemente diferentes entre sí, entonces las poblaciones mostrarán cierta diferencia otra vez. Lo opuesto a la selección equilibrada es la selección contra los heterocigotos, la cual produce equilibrios inestables. Este tipo de selección favorecerá la homocigosidad y la divergencia entre poblaciones.

Cimas adaptativas múltiples

Debemos evitar adoptar un punto de vista demasiado simplista de las consecuencias de la selección. En el nivel del gen (e incluso en el nivel del fenotipo parcial) el resultado de la selección para un rasgo en un ambiente dado, no es unívoco. La selección para alterar un rasgo (digamos, incrementar el tamaño) puede tener éxito de varios modos. En 1952, F. Robertson y E. Reeve practicaron con éxito una selección para cambiar el tamaño del ala de *Drosophila* en dos poblaciones diferentes. Sin embargo, en un caso cambió el *número* de células del ala, mientras que en el otro caso cambió el *tamaño* de las células del ala. Se habían seleccionado dos genotipos diferentes, ambos capaces de provocar un cambio del tamaño del ala. El estado inicial de la población al comienzo del experimento determinó cuál de las dos selecciones tendría lugar.

El modo por el que el mismo tipo de selección puede conducir a diferentes resultados se puede ilustrar con la máxima comodidad mediante un ejemplo hipotético. Supongamos que la variación en dos loci (normalmente habrá muchos más) influye en un carácter, y que (en un ambiente particular) los fenotipos medianos tienen la máxima aptitud biológica (por ejemplo, los niños recién nacidos tienen una probabilidad más alta de sobrevivir si no son ni demasiado grandes ni demasiado pequeños). Si los alelos actúan de modo simple al influir en el fenotipo, entonces las tres constituciones genéticas *AB/ab*, *Ab/Ab* y *aB/aB* determinarán una aptitud biológica alta porque las tres darán el fenotipo mediano. Por otra parte, una aptitud biológica muy baja caracterizará a los dobles homocigotos *AB/AB* y *ab/ab*. ¿Cuál será el resultado de la selección? Podemos predecir el resultado utilizando la aptitud biológica media de la población. Como discutimos previamente, la selección provoca el incremento de $\overline{W}$ en la mayoría de los casos simples. Por consiguiente, si calculamos $\overline{W}$ para cada posible combinación de frecuencias alélicas en los dos loci, podemos determinar qué combinaciones producen valores altos de $\overline{W}$. Entonces deberíamos ser capaces de predecir el curso de la selección siguiendo una curva en la que aumente $\overline{W}$.

La *superficie de la aptitud biológica media para todas las combinaciones de las frecuencias alélicas* se denomina **superficie adaptativa** o **paisaje adaptativo** (Fig. 26-6). La figura es como un plano topográfico. Se representa en un eje la frecuencia del alelo *A* en un locus, y en el otro eje se representa la frecuen-

(a)

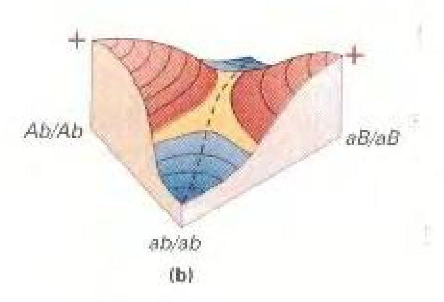


Figura 26-6. Un paisaje adaptativo con dos cimas adaptativas (en rojo), dos valles adaptativos (en azul) y un collado topográfico en el centro del paisaje. Las líneas topográficas son líneas de igual aptitud biológica media. Si la composición genética de una población cambia siempre de manera que la desplaza hacia arriba en el paisaje, entonces la composición final dependerá de dónde comenzó la población con respecto a la línea de descenso (discontinua). (a) Mapa topográfico del paisaje adaptativo. (b) Un croquis en perspectiva de la superficie mostrada en el mapa.


(a)


(b)

Figura 26-7. Diferencias en la forma del cuerno de dos especies de rinoceronte separadas geográficamente: (a) rinoceronte africano; (b) rinoceronte de la India (Parte a de Anthony Bannister/NHPA; parte b de K. Ghani/NHPA.)

cia del alelo *B* en el otro locus. La altura sobre el plano (representada por las líneas topográficas) es el valor de $\overline{W}$ que la población tendría para esa combinación particular de frecuencias de *A* y *B*. De acuerdo con la regla de la aptitud biológica creciente, la selección llevará a la población desde un «valle» de baja aptitud biológica hasta una «cima» de alta aptitud biológica. Sin embargo, la Figura 26-6 muestra que existen dos cimas adaptativas, que corresponden a una población en la que se haya fijado *Ab*/*Ab* y a otra en la que se haya fijado *aB*/*aB*, con un valle adaptativo entre ellas. A qué cima ascenderá la población —y por consiguiente, cuál será su composición final— depende de si la composición genética inicial de la población cae a un lado o al otro de la «línea de descenso» discontinua que se muestra en la figura.

COROLARIO

Bajo condiciones idénticas de selección natural, dos poblaciones pueden alcanzar dos composiciones genéticas diferentes como resultado directo de la selección natural.

Es importante darse cuenta de que nada en la teoría de la selección implica que las alturas de las diferentes cimas adaptativas sean iguales. La cinética de la selección es tal que $\overline{W}$ aumenta, pero no de tal manera que necesariamente deba alcanzar la cima más alta posible en el campo de las frecuencias alélicas. Supongamos, por ejemplo, que una población está cerca de la cima *aB*/*aB* de la Figura 26-6 y que esa cima es más baja que la cima *Ab*/*Ab*. La selección por sí sola no puede llevar a la población hasta *Ab*/*Ab* porque eso requeriría una disminución transitoria de $\overline{W}$, cuando la población descendiera por la pendiente de *aB*/*aB* para cruzar el valle y ascender por la otra pendiente. Es decir, la fuerza de la selección es «miope». Guía a la población hasta un máximo *local* de $\overline{W}$ en el paisaje de las frecuencias alélicas, no hasta uno *global*.

La existencia de cimas adaptativas múltiples en un proceso selectivo significa que algunas diferencias entre especies son el resultado de la historia y no de diferencias ambientales. Por ejemplo, los rinocerontes de África tienen dos cuernos, mientras que los de la India tienen uno (Fig. 26-7). No necesitamos inven-

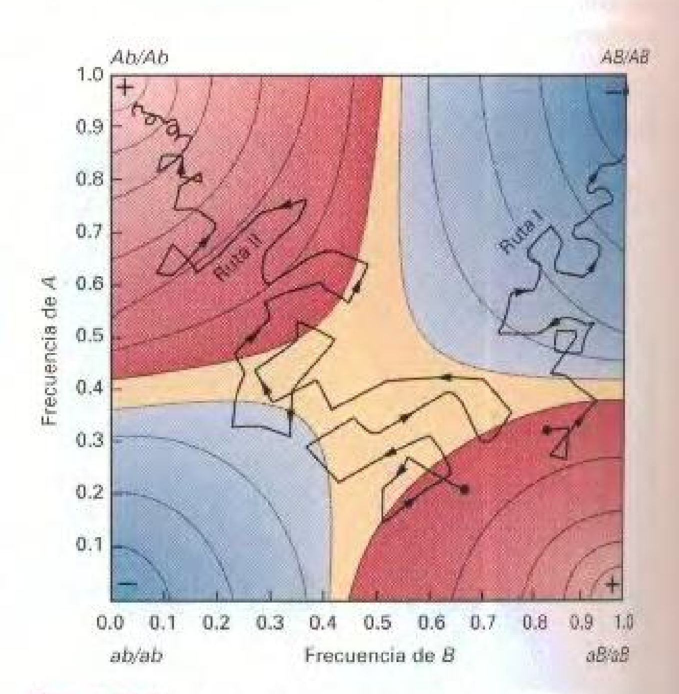


Figura 26-8. La selección y la deriva genética pueden interaccionar y producir distintos cambios en las frecuencias alélicas en un paisaje adaptativo. Sin deriva genética aleatoria, ambas poblaciones se desplazarían hacia el genotipo *aB*/*aB* como resultado de la selección exclusivamente.

tar ninguna historia especial de por qué sería mejor tener dos cuernos en las llanuras de África y uno en la India. Es mucho más plausible suponer que el rasgo de tener cuernos estuvo sujeto a selección, pero que los dos cuernos largos y delgados, y el cuerno único, corto y robusto, son simplemente características adaptativas alternativas, y que las especies difirieron por un accidente histórico. Las explicaciones de las adaptaciones por selección natural no requieren que cada una de las diferencias entre especies sea una adaptación diferencial.

Exploración de las cimas adaptativas

No se debe considerar al azar y a las fuerzas de la selección como simples antagonistas. La deriva genética aleatoria puede contrarrestar el efecto de la selección en ocasiones, pero otras veces también lo puede acrecentar. El resultado del proceso evolutivo es la consecuencia de la acción simultánea de ambos fenómenos. La Figura 26-8 ilustra estas posibilidades. En ese «paisaje» hay cimas adaptativas múltiples. Debido a la deriva genética aleatoria, una población bajo presión selectiva no asciende de forma directa a una cima adaptativa suavemente. Por el contrario, adopta un camino errático en el terreno de las frecuencias alélicas, al igual que le ocurre a un montañero exhausto con falta de oxígeno. La ruta I describe una historia poblacional donde la adaptación ha fracasado. Las fluctuaciones aleatorias de las frecuencias alélicas fueron lo suficientemente importantes para que, por azar, se fijara en la población un genotipo de escasa aptitud biológica. En cualquier población, en cierta proporción de los loci se fijan alelos selectivamente desfavorables, ya que la intensidad de la selección no es lo suficientemente elevada para superar la fijación de esos alelos por efecto de la deriva aleatoria. La existencia de cimas adaptativas múltiples y la fijación al azar de alelos menos aptos son facetas consustanciales del proceso evolutivo. No podemos tener la certeza de que la selección natural dé lugar siempre a la mejor de las posibles alternativas.

Por otro lado, la ruta II de la Figura 26-8 muestra cómo la deriva aleatoria puede mejorar la adaptación. La población se encontraba al principio bajo la influencia de la cima adaptativa inferior; sin embargo, por la fluctuación aleatoria de la frecuencia alélica, su composición atravesó el valle adaptativo, y la población alcanzó la cima adaptativa más alta e inclinada. Este paso desde un estado estable adaptativo inferior a otro superior no podría haber ocurrido jamás por el efecto de la selección en una población infinita, porque únicamente por selección W nunca podría disminuir temporalmente para cruzar de una pendiente a la otra.

Una fuente importante de indeterminación en el resultado final de un largo proceso selectivo es la aleatoriedad del proceso mutacional. Una vez que se agota la variación genética inicial a causa de que determinados alelos queden fijados por las fuerzas de la selección y la deriva genética, surgen nuevos alelos por mutación que, de nuevo, pueden suponer la materia prima de un cambio evolutivo adicional. La dirección que tome este nuevo cambio evolutivo depende de las mutaciones concretas que tengan lugar y la escala de tiempo en que éstas ocurran. Un ejemplo muy ilustrativo de esta contingencia histórica del proceso evolutivo es el experimento de selección llevado a cabo por H. Wichman y sus colaboradores. Permitieron que el fago ΦX174 se reprodujera a altas temperaturas y que cambiara de hospedador, de *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*. Se establecieron dos líneas de selección independientes, que evolucionaron tanto respecto a la temperatura como respecto al cambio de bacteria hospedadora. Una de las dos líneas todavía retenía la capacidad de reproducirse en *Escherichia coli*, pero la otra línea la perdió. El bacteriófago sólo posee 11 genes, de manera que se registraron los cambios sucesivos ocurridos en el DNA de todos

CUADRO 26-3. Cambios moleculares en dos réplicas de líneas de selección, TX e ID, para cambiar la tolerancia a la temperatura y el rango de hospedador en el bacteriófago ΦX174

	TX				ID			
Orden	Lugar	Gen	Aminoácido	Cambio	Lugar	Gen	Aminoácido	Cambio
1	782	*E*	72	T → I	2167	*F*	388	H → Q
2	1727	*F*	242	L → F	1613	*F*	204	T → S
3	2085	*F*	361	A → V	**1533**	***F***	**177**	**T → I**
4	319	*C*	63	V → F	1460	*F*	153	Q → E
5	2973	*H*	15	G → S	1300	*F*	99	Silencioso
6	323	*C*	64	D → G	**1305**	***F***	**101**	**G → D**
7	**4110**	***A***	**44**	**H → Y**	1308	*F*	102	Y → C
8	1025	*F*	8	E → K	**4110**	***A***	**44**	**H → Y**
9	**3166**	***H***	**79**	**A → V**	4637	*A*	219	Silencioso
10	5185	*A**	402	T → M	**965-991**		**deleción**	
11	**1305**	***F***	**101**	**G → D**	**5365**	***A****	**462**	**M → T**
12	**965-991**		**deleción**		**4168**	***A***	**63**	**Q → R**
13	**5365**	***A****	**462**	**M → T**	**3166**	***H***	**79**	**A → V**
14	**1533**	***F***	**177**	**T → I**	1809	*F*	269	K → R
15	**4168**	***A***	**63**	**Q → R**				

Nota: el orden temporal de las mutaciones se encuentra en la primera columna. Los cambios aparecen como números correspondientes al lugar del nucleótido, el nombre del gen (*A-H*), el número del residuo de aminoácido y la naturaleza de la sustitución. Las abreviaturas de los aminoácidos son como en el Cuadro 9.3. Los cambios idénticos en ambas estirpes aparecen en negrita.
Fuentes: datos de H. A. Wichman, M. R. Badgett, L. A. Scott, C. M. Boulianne y J. J. Bull. *Science* 285, 1999, 422-424.

estos genes durante el proceso evolutivo, así como en los polipéptidos correspondientes. Los resultados para ambas estirpes se muestran en el Cuadro 26-3. Ocurrieron 15 cambios en el DNA en la estirpe TX, repartidos en 6 de los 11 genes; en la estirpe ID tuvieron lugar 14 cambios, distribuidos en 4 de los 11 genes. Ambas estirpes experimentaron cambios idénticos en sólo 7 ocasiones, lo que incluía una deleción de gran tamaño, pero el orden temporal de estos cambios idénticos difería entre ambas líneas. Así, por ejemplo, el cambio en la posición 1533 del DNA, que causa una sustitución de treonina por isoleucina, constituyó el tercer cambio en la estirpe ID y el decimocuarto en la estirpe TX.

Heredabilidad de la variación

La primera regla para cualquier reconstrucción o predicción de la evolución es que la variación fenotípica debe ser heredable. Es sencillo confeccionar un argumento sobre la posible ventaja selectiva de una de las formas de un carácter sobre otra alternativa, pero supone una gran dificultad experimental demostrar que esa variación en el rasgo se corresponde con diferencias genotípicas (véase el Cap. 25).

No se debería suponer que todas las características que muestran variación son heredables. Ciertas características metabólicas (como la resistencia a elevadas concentraciones de sal en *Drosophila*) presentan una variación individual, pero no heredabilidad. En general, los rasgos del comportamiento muestran una heredabilidad menor que los morfológicos, sobre todo en organismos con sistemas nerviosos más complejos, los cuales exhiben una flexibilidad individual inmensa respecto a los estados del sistema nervioso central. Antes de que se pueda realizar ningún juicio sobre la evolución de un rasgo cuantitativo concreto, es esencial determinar si existe variación genética en la población para esa característica cuya evolución se pueda predecir. Por eso, las propuestas de que ciertas características de la especie humana, como el rendimiento en las pruebas de inteligencia o cociente intelectual (CI), la personalidad o la organización social, se encuentran inmersos en pleno proceso evolutivo o han evolucionado en épocas concretas de la historia de la humanidad, dependen de manera sustancial de que haya evidencias sólidas de que existe variación genética para tales características. Por otra parte, puede que características que aparecen en una especie como absolutamente invariables, sin embargo evolucionen.

Uno de los hallazgos más importantes en Genética evolutiva fue el descubrimiento de un cuantioso nivel de variación genética que subyace en caracteres que ¡no muestran variación morfológica alguna! Estos caracteres reciben el nombre de **caracteres canalizados**, porque el resultado final de su desarrollo se preserva entre estrechos márgenes, a resguardo de cualquier fuerza perturbadora. El desarrollo es de tal manera, que todos los genotipos distintos para un carácter canalizado exhiben el mismo fenotipo constante, dentro de un rango de ambientes normales para la especie. Las diferencias genéticas se ponen de relieve si se somete a los organismos a condiciones de estrés o si una mutación muy severa compromete seriamente el sistema de desarrollo. Por ejemplo, todas las moscas *Drosophila* silvestres poseen exactamente cuatro quetas en el escutelo (Fig. 26-9). Si se da la mutación recesiva *scute*, el número de quetas se reduce pero, además, se produce variación de mosca a mosca. Esta variación es heredable, y se han obtenido líneas, por selección en presencia de la mutación *scute*, con una o ninguna queta, y líneas con tres o cuatro quetas. Cuando se elimina la mutación, estas líneas desarrollan dos y seis quetas respectivamente. Se han llevado a cabo experimentos parecidos usando condiciones ambientales con situaciones de estrés extremas en lugar de mutantes. Una consecuencia de tal variación genética oculta es que un carácter que es fenotípicamente uniforme en una especie, puede no obstante experimentar una rápida evolución si una situación de estrés revela la variación genética.



Figura 26-9. Quetas del escutelo de una mosca adulta *Drosophila*, representadas en color azul. Éste es un ejemplo de un carácter canalizado; todas las moscas *Drosophila* silvestres tienen cuatro quetas del escutelo en un amplio margen medioambiental.

Variación visible dentro de la población y entre poblaciones distintas

En el Capítulo 24 se discutió extensamente la existencia de variación genética en las poblaciones, tanto desde el punto de vista morfológico, como en el cariotipo, las proteínas o el DNA. La conclusión general es que alrededor de un tercio de todos los loci que determinan proteínas son polimórficos y que todas las clases de DNA, incluyendo exones, intrones, secuencias reguladoras y secuencias intergénicas, muestran diferencias nucleotídicas entre los individuos de una población. Varios de estos ejemplos también ponían de manifiesto algunas diferencias en las frecuencias alélicas entre diversas poblaciones (véanse los Cuadros 24-1 a 24-3, 24-5 y 24-7). La magnitud relativa de la variación dentro de la población y entre distintas poblaciones varía de especie a especie, dependiendo de la historia y del medio ambiente. En nuestra especie, algunas frecuencias alélicas (por ejemplo, las relacionadas con el color de piel o la forma del cabello) están bien diferenciadas entre poblaciones y los principales grupos geográficos (las llamadas razas geográficas). No obstante, la situación es completamente diferente si observamos genes individuales que determinan proteínas, que se identifican inmunológicamente o por electroforesis, más que por un rasgo fenotípico

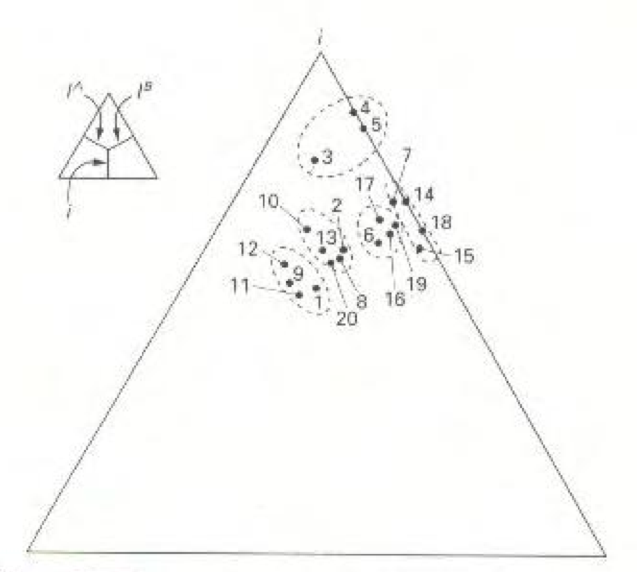


Figura 26-10. Diagrama trialélico de las frecuencias alélicas del sistema ABO de grupos sanguíneos en diferentes poblaciones humanas. Cada punto representa una población; las distancias perpendiculares desde el punto a los lados del triángulo representan las frecuencias alélicas, como se indica en el triángulo pequeño. Las poblaciones 1 a 3 son africanas, de la 4 a la 7 son indios americanos, de la 8 a la 13 poblaciones asiáticas, 14 y 15 aborígenes australianos, y de la 16 a la 20 europeos. Las líneas discontinuas engloban clases arbitrarias con frecuencias alélicas parecidas; estos agrupamientos no se corresponden con clases «raciales» (De A. Jacquard, *Structures génétiques des populations*. Copyright © 1970 by Masson et Cie.).

externo. El cuadro 26-2 muestra los tres loci para los que se sabe que caucasianos, negroides y mongoloides difieren más entre sí (los grupos sanguíneos Duffy y Rhesus y el antígeno P), y se comparan con los tres loci polimórficos para los que son más similares (el grupo sanguíneo Auberger y los factores Xg y de secreción). Incluso para los loci más divergentes, ninguna raza es homocigótica para algún alelo que esté ausente en las otras dos razas.

En general, las diversas poblaciones humanas exhiben frecuencias muy similares para los genes polimórficos. La Figura 26-10 es un **diagrama trialélico** para las tres principales clases alélicas, I^A, I^B e i, del sistema de grupos sanguíneos ABO. Cada punto representa la composición alélica de una población, donde las tres frecuencias alélicas se pueden leer tomando las longitudes de las perpendiculares desde el punto a cada lado del triángulo. El diagrama pone de relieve que todas las poblaciones humanas están agrupadas en la región de las frecuencias elevada para i, intermedia para I^A y baja para I^B. Es más, los puntos cercanos entre sí (englobados por una línea discontinua) no se corresponden con razas geográficas, tales razas no se pueden distinguir unas de otras mediante frecuencias alélicas características para este gen. El estudio, en diversas poblaciones humanas, de polimorfismos de grupos sanguíneos y loci enzimáticos ha puesto de manifiesto que alrededor del 85 % de toda la diversidad genética humana se halla dentro de la misma población, sólo un 7 % de esta diversidad se encuentra entre distintas poblaciones pertenecientes a la misma raza geográfica y el 8 % restante entre las principales razas geográficas. Evidentemente, los genes que influyen en el color de la piel, la forma del cabello y la morfología facial, rasgos que están bien diferenciados entre razas, no son una muestra representativa de los loci génicos estructurales.

El proceso de especiación

Cuando observamos el mundo viviente, vemos que los organismos individuales suelen aparecer asociados en grupos donde más o menos se asemejan unos a otros, mientras que muestran claras diferencias con los individuos pertenecientes a otros grupos. Un examen minucioso de los descendientes de una mosca *Drosophila* revelará diferencias de mosca a mosca en el número de quetas, el tamaño de los ojos y diversos detalles en el patrón de coloración. Sin embargo, un entomólogo no tiene dificultad alguna en distinguir entre, digamos, *Drosophila melanogaster* y *Drosophila pseudoobscura*. Nunca se observa una mosca que se encuentre a medio camino entre estos dos tipos. Está claro que, en la naturaleza al menos, no hay cruzamientos entre estas dos formas. Un grupo de organismos que intercambia genes dentro del grupo, pero no puede hacer lo mismo con los individuos de otros grupos, es lo que llamamos una **especie**. En el seno de una especie, pueden existir poblaciones locales que también se pueden distinguir fácilmente unas de otras por alguna característica fenotípica. Por eso no se tiene ninguna dificultad en distinguir a un senegalés «típico» de un sueco «típico»; no obstante, como consecuencia de la migración y la historia de los emparejamientos en lugares como Norteamérica en los últimos 300 años, existe un grandísimo número de personas que exhiben fenotipos intermedios entre estos dos tipos geográficos locales en todos los puntos de una supuesta escala de intensidad. No se trata de especies separadas. Una población definida geográficamente que se distingue genéticamente de forma clara de otras poblaciones locales, pero que puede intercambiar genes con esas otras poblaciones locales, es denominada a veces como **raza geográfica**. Por ejemplo, en relación con el caracol terrestre *Cepaea nemoralis*, cuyos polimorfismos en el color y el patrón de bandas del caparazón se describieron en el Capítulo 24, existe una elevada frecuencia de caparazones albinos en los Pirineos, en las cotas más altas, pero en ninguna otra parte más; por lo tanto podemos distinguir una «raza» pirenáica de *Cepaea*. En general, hay algunas diferencias en las frecuencias para varios genes en las distintas poblaciones geográficas de una especie, por lo que la decisión de que una población concreta constituye una raza no deja de ser arbitraria y, como consecuencia de ello, el concepto de raza no se usa mucho en Biología.

COROLARIO

Una especie es un grupo de organismos que pueden intercambiar genes entre ellos, pero son incapaces de intercambiar genes en la naturaleza con otros grupos. Una raza geográfica es una población local, distinguible fenotípicamente dentro de una especie, que es capaz de intercambiar genes con otras razas dentro de la especie. Como casi todas las poblaciones geográficas difieren unas de otras en cuanto a las frecuencias alélicas de algunos genes, el concepto de raza no establece una distinción biológica clara.

Todas las especies que existen actualmente están relacionadas unas con otras por compartir antepasados comunes en diversos momentos del pasado evolutivo. Esto quiere decir que cada especie se ha separado de una especie preexistente, convirtiéndose en una forma genéticamente distinta y genéticamente aislada respecto a su línea ancestral. En circunstancias extraordinarias, la creación de un grupo aislado genéticamente puede ocurrir por efecto de una mutación única, pero el portador de esa mutación tendría que ser capaz de autofertilizarse o reproducirse vegetativamente. Además, esa mutación tendría que causar una incompatibilidad de apareamiento completa entre su portador y el resto de la especie original para que ello permitiera que la nueva línea pudiera competir con éxito con el grupo establecido previamente. Aunque no sean imposibles, tales sucesos deben ser muy infrecuentes.

La vía habitual hacia la formación de una nueva especie es a través de las razas geográficas. Como se mencionó anteriormente en este mismo capítulo, las poblaciones que están separadas geográficamente se diferenciarán genéticamente unas de otras como consecuencia de la acción combinada de mutaciones únicas, la selección y la deriva genética aleatoria. La migración entre poblaciones, sin embargo, contrarrestará estos efectos y evitará que esta divergencia vaya demasiado lejos. Como se estableció en la página 778, incluso un único inmigrante por generación será suficiente para impedir que las poblaciones queden fijadas en alelos alternativos por la acción exclusiva de la deriva genética, e incluso la selección hacia distintas cimas adaptativas no conseguirá una divergencia completa a menos que sea extraordinariamente fuerte. Como consecuencia de esto, las poblaciones que se diferencian lo suficiente para convertirse en una nueva especie aislada reproductivamente, primero se deben aislar totalmente unas de otras por alguna barrera mecánica. Este aislamiento requiere casi siempre alguna separación espacial, y la separación debe ser lo suficientemente grande o las barreras naturales que impiden el paso de inmigrantes lo suficientemente importantes como para evitar cualquier migración efectiva. A dichas poblaciones se les llama **alopátricas**. La barrera aislante podría ser, por ejemplo, la lengua de un glaciar continental en expansión durante las glaciaciones que separa a una población que se encontraba distribuida de manera continua, o la deriva de los continentes que acaban separados por los océanos, o la colonización poco frecuente de islas que se encuentran alejadas del continente. A partir de aquí, la cuestión fundamental es saber si los mecanismos de dispersión de la especie original evitan o no las migraciones entre las poblaciones que se han separado. Si se impide la migración, o se convierte en un suceso extraordinariamente raro, entonces las poblaciones se vuelven independientes genéticamente y continuarán su divergencia por mutación, selección y deriva genética. Ocasionalmente, la diferenciación genética entre las poblaciones alcanzará tal magnitud que la formación de híbridos será imposible debido a razones fisiológicas, de desarrollo o de comportamiento, incluso tras la desaparición de la barrera geográfica que las separaba. Estas poblaciones aisladas *biológicamente* son ahora especies nuevas, formadas mediante un proceso de **especiación alopátrica**.

COROLARIO

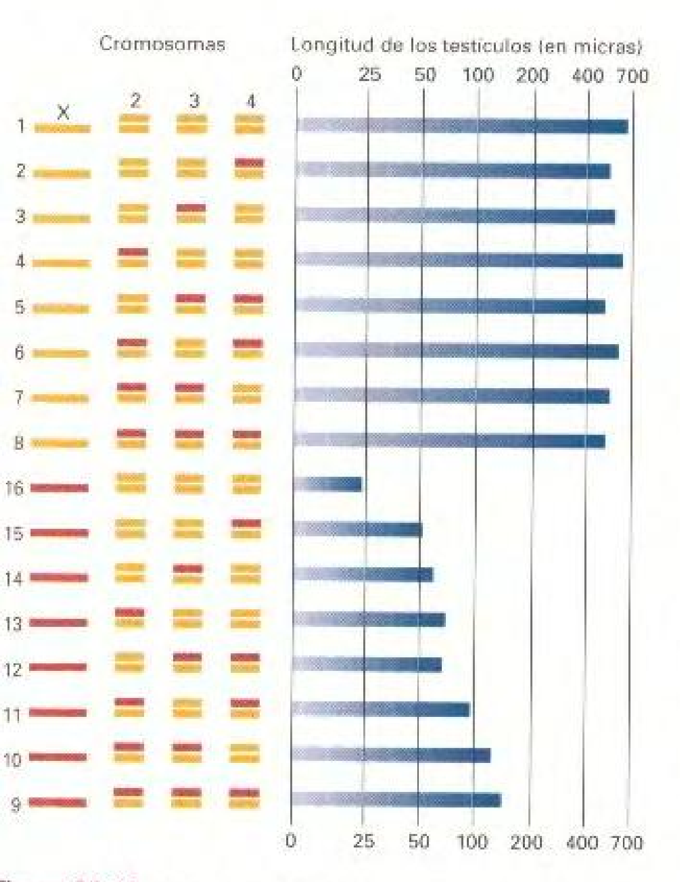
La especiación alopátrica tiene lugar debido a una separación mecánica y geográfica de las poblaciones que impide cualquier flujo génico entre ellas, seguido de una divergencia genética por parte de las poblaciones ya aisladas, suficiente como para imposibilitar en un futuro el intercambio de genes.

Entre los mecanismos de aislamiento biológico que surgen entre las especies, podemos distinguir:

1. **Aislamiento precigótico:** incompatibilidad para formar un cigoto
   - **a.** Falta de oportunidades de apareamiento.
     - **i.** Aislamiento temporal: actividad, fertilidad o apareamiento en ocasiones o estaciones del año diferentes.
     - **ii.** Aislamiento ecológico: restricción por ocupar hábitats o nichos ecológicos no solapados.
   - **b.** Incompatibilidad en el apareamiento.
     - **i.** Incompatibilidad sexual, psicológica o de conducta.
     - **ii.** Aislamiento mecánico: incompatibilidad de los genitales o los órganos florales.
     - **iii.** Aislamiento gamético: incompatibilidad fisiológica del esperma con el conducto reproductivo de la hembra en animales, o del polen con el estigma en las plantas, o por defectos en la adecuada fertilización del óvulo.

Los ejemplos de aislamiento precigótico son bien conocidos tanto en el mundo animal como entre las plantas. Las dos especies de pino que crecen en la península de Monterrey, *Pinus radiata* y *P. muricata*, arrojan su polen en febrero y en abril respectivamente, y así no intercambian genes. Las señales luminosas que emiten los machos de luciérnaga para atraer a las hembras difieren en intensidad y ritmo entre las distintas especies. En la mosca tsetsé, *Glossina*, las incompatibilidades mecánicas causan serios daños e incluso la muerte si los machos de una especie se aparean con hembras de otra. El polen de distintas especies de *Nicotiana*, el género al cual pertenece el tabaco, cuando se posa en el estigma de otra especie, o bien falla la germinación o bien no puede crecer a través del estilo.

2. **Aislamiento poscigótico:** defecto en el cigoto fertilizado por el que no puede suministrar gametos para las siguientes generaciones.
   - **a.** Inviabilidad del híbrido: los híbridos presentan fallos en el desarrollo o muestran una aptitud inferior a la de los individuos de las especies parentales.
   - **b.** Esterilidad del híbrido: incapacidad completa o parcial de los híbridos adultos de cualquier sexo para producir un número normal de gametos.
   - **c.** Depresión del híbrido: esterilidad o inviabilidad de los descendientes de apareamientos entre híbridos o entre híbridos e individuos de las especies parentales.



igura 26-11. Tamaño de los testículos en retrocruzamientos con íbridos de *Drosophila pseudoobscura* y *D. persimilis*. Los cromosomas de *D. seudoobscura* se representan en naranja y los de *D. persimilis* en rojo.

La esterilidad poscigótica es más corriente entre los animales ue en las plantas, aparentemente debido a que el desarrollo de nuchas plantas es mucho más tolerante frente a las incompatibiliades genéticas y las variaciones cromosómicas. Cuando los hueos de la rana leopardo, *Rana pipiens*, se fertilizan con esperma de a rana arborícola, *R. sylvatica*, los embriones no logran desarrollare. Se pueden cruzar fácilmente caballos y asnos para originar muas pero, como es de sobra conocido, dichos híbridos son estériles.

enética del aislamiento de especies

lormalmente no es posible realizar ningún tipo de análisis genéico de los mecanismos de aislamiento entre dos especies, por la imple razón de que, por definición, no se pueden llevar a cabo ruzamientos entre ellas. No obstante, es posible hacer uso de species estrechamente emparentadas en las que los mecanismos e aislamiento se basan en esterilidad incompleta de los híbrios, así como en la depresión de los híbridos. Entonces se pueen analizar los individuos de generaciones F_2, o procedentes de etrocruzamientos, mediante el uso de marcadores genéticos. En Figura 26-11 se expone un ejemplo. *Drosophila pseudoobscua* y *D. persimilis* son especies muy cercanas que nunca interambian genes en la naturaleza pero sí que se pueden cruzar en l laboratorio. Los machos F_1 son completamente estériles, pero s hembras F_1 presentan una fertilidad normal y se pueden realizar retrocruzamientos con machos de las especies parentales. Una manifestación de la esterilidad masculina en los híbridos es que, en los cruzamientos entre machos de *D. pseudoobscura* y hembras de *D. persimilis*, los machos F_1 exhiben unos testículos de, aproximadamente, un quinto de su tamaño normal. Marcando genéticamente cada cromosoma con mutaciones visibles y retrocruzando las hembras F_1 con machos de ambas especies, se logra identificar cualquier combinación de cromosomas X y autosomas, y se puede determinar su efecto sobre el tamaño de los testículos. Como se observa en la Figura 26-11, cuando un cromosoma X de una especie se halla presente junto con un juego diploide completo de autosomas de la otra especie, los testículos presentan su menor tamaño. A medida que se sustituyen los autosomas por los de la especie que aporta el cromosoma X, aumenta el tamaño de los testículos, alcanzando un máximo cuando se alcanza una dotación haploide completa, pero no más allá. También existen evidencias (aunque no se muestra) de una interacción entre el cromosoma X y el citoplasma.

Cuando se han llevado a cabo tales experimentos con marcadores en otras especies, fundamentalmente en el género *Drosophila*, las conclusiones generales a las que se llega son que las diferencias en genes responsables de la inviabilidad del híbrido se encuentran distribuidas en todos los cromosomas de una manera más o menos uniforme, y que, para la esterilidad del híbrido, existe algún efecto añadido del cromosoma X. En los casos de aislamiento debido al comportamiento sexual, los resultados son variables. En *Drosophila*, todos los cromosomas están implicados pero, en los lepidópteros, los genes responsables están mucho más localizados, aparentemente por la implicación de feromonas específicas. El cromosoma sexual tiene un efecto muy fuerte en las mariposas: en el taladro europeo del maíz, sólo tres loci, uno de los cuales se encuentra en el cromosoma sexual, son responsables del completo aislamiento entre las diferentes razas que se distinguen por su feromona específica.

El origen de nuevos genes

Está claro que la evolución consiste en algo más que en la sustitución de un alelo por otro en loci con funciones definidas. Han surgido nuevas funciones que han originado grandes radiaciones de nuevas formas de vida. Muchas de estas funciones, por ejemplo, el desarrollo del oído interno de los mamíferos a partir de una transformación del hueso de la mandíbula en los reptiles, son el resultado de variaciones continuas de la forma para las que no tenemos que acudir necesariamente a nuevos genes y proteínas. Pero las novedades cualitativas surgen a nivel de los genes y las proteínas, como el origen de la fotosíntesis en las plantas, de las paredes celulares, de las proteínas contráctiles, de una gran variedad de tipos de células y tejidos, de las moléculas transportadoras de oxígeno como la hemoglobina, del sistema inmunitario, de los ciclos de destoxificación química y de las enzimas digestivas. Las funciones metabólicas más antiguas se han mantenido por necesidad, mientras se desarrollaban otras nuevas, lo que viene a significar que se tenían que preservar los genes antiguos a la vez que tenían que evolucionar nuevos genes con nuevas funciones. ¿De dónde viene este nuevo DNA con nuevas funciones?

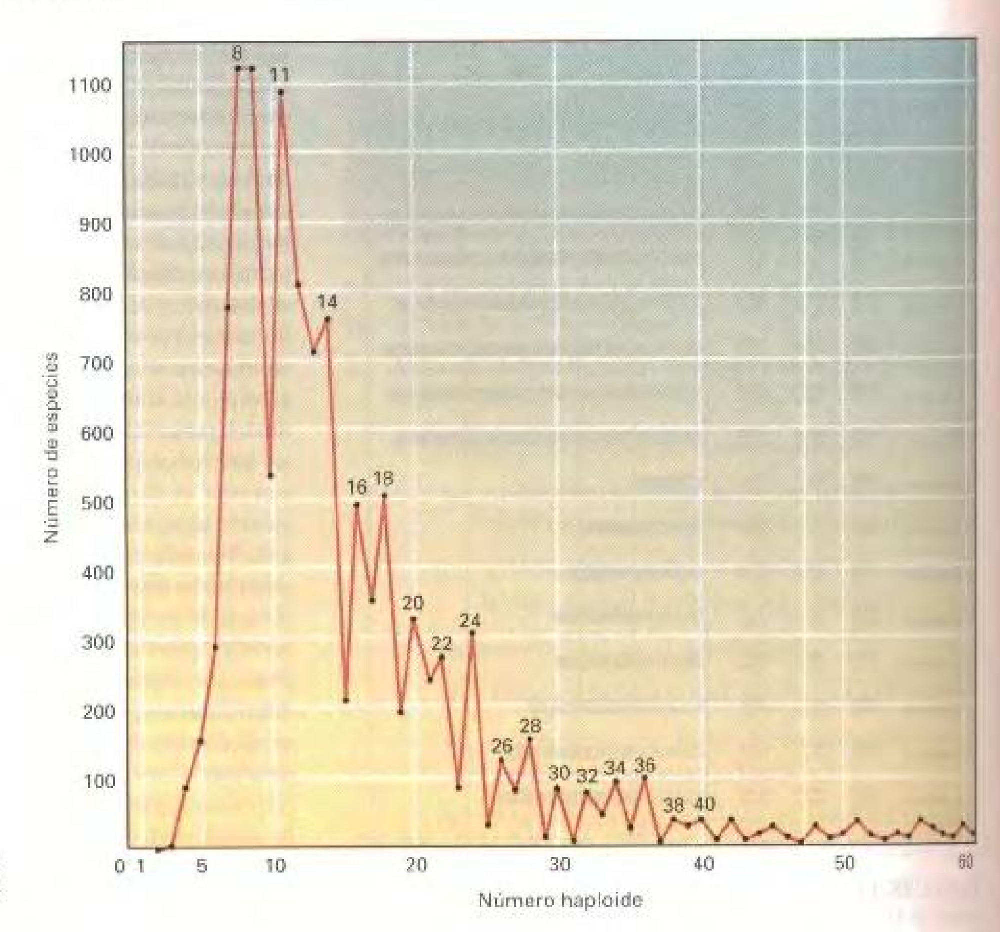


Figura 26-12. Distribución de frecuencias de números haploides de cromosomas entre las plantas dicotiledóneas (De Verne Grant, *The Origin of Adaptations*, Columbia University Press, 1963.)

Poliploidía

Un proceso que suministra nuevo DNA es la duplicación del genoma completo por poliploidización, mucho más común en las plantas que en los animales (Cap. 18). Observando la Figura 26-12, que muestra la distribución de frecuencias de números haploides de cromosomas entre las especies de plantas dicotiledóneas, resulta evidente que la poliploidía ha desempeñado un

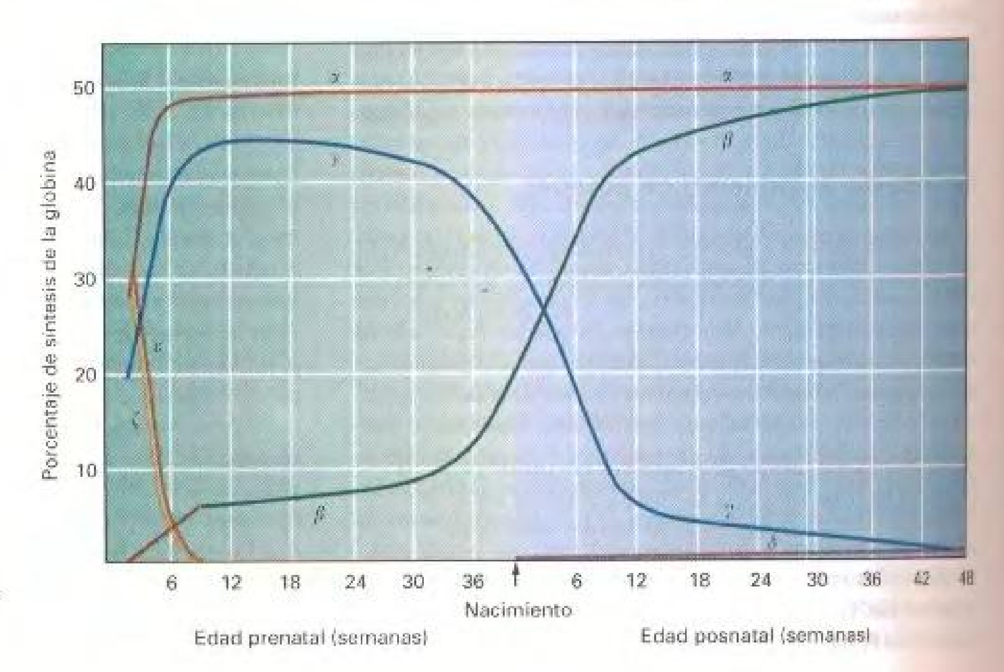


Figura 26-13. Cambios que se producen durante el desarrollo en la síntesis de globinas de tipo α y de tipo β para componer la hemoglobina humana.

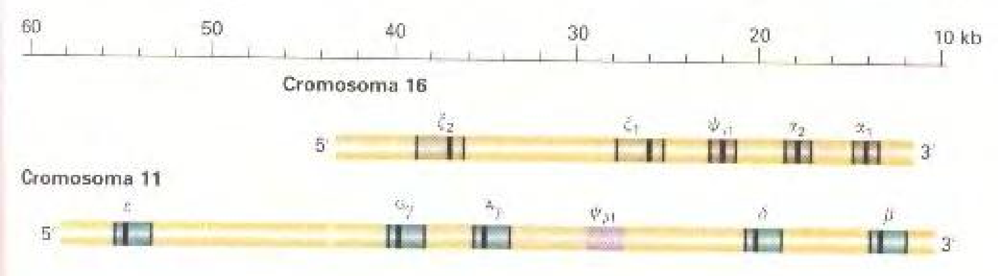


Figura 26-14. Distribución cromosómica en la especie humana de los genes de la familia génica de las globinas de tipo α en el cromosoma 16 y de la familia de tipo β en el cromosoma 11. La estructura génica se muestra con barras negras (exones) y barras coloreadas (intrones).

papel fundamental en la evolución de las especies vegetales. Cuando el número de cromosomas alcanza alrededor de 12, los números pares son mucho más frecuentes que los impares, una consecuencia de que la poliploidía sea tan frecuente.

Duplicaciones

Un segundo proceso de incremento de DNA es la duplicación de pequeños fragmentos del genoma como consecuencia de errores en la replicación (Cap. 16). Al principio, una vez que se ha duplicado un fragmento, existe la posibilidad de que se produzca un aumento en la producción de un polipéptido codificado en ese fragmento, y entonces se puede producir una diferenciación funcional entre las dos secuencias en una de las direcciones que se describen a continuación. En un caso, no tiene lugar ningún cambio funcional y simplemente se produce una duplicación en la síntesis del polipéptido. La función general de la secuencia original se mantiene en el nuevo DNA, pero se va creando paulatinamente una diferenciación funcional de las secuencias debido a la acumulación de mutaciones, de forma que se producen variaciones sobre la misma proteína, lo que posibilita una estructura molecular de algún modo más compleja. Un ejemplo clásico lo constituye la serie de duplicaciones y divergencias génicas que subyacen a la producción de las diferentes hemoglobinas humanas. La hemoglobina adulta es un tetrámero que consta de dos cadenas polipeptídicas α y dos cadenas β, cada una de ellas con un grupo hemo unido a la molécula. El gen que determina la cadena α se encuentra en el cromosoma 16 y el gen para la cadena β está en el cromosoma 11, pero ambas cadenas muestran un porcentaje del 49 % de identidad en su secuencia aminoacídica, una identidad que claramente indica un origen común. Sin embargo, en los fetos hasta el momento del nacimiento, sólo se encuentra aproximadamente un 20 % de las cadenas β presentes en el adulto. El 80 % restante de las cadenas pertenecen a un tipo relacionado, conocido como cadena γ. Las cadenas β y γ muestran un porcentaje de identidad del 75 %, y sus genes se encuentran próximos entre sí en el cromosoma 11, con una disposición idéntica de exones e intrones. Este cambio en la síntesis de globinas con el desarrollo es parte de un conjunto mayor de cambios, los cuales aparecen en la figura 26-13. El embrión comienza en una fase temprana con las ca-

CUADRO 26-4. **Porcentaje de similitud en las secuencias de aminoácidos entre las cadenas de globina humana**

	α	ζ	β	γ	ε
α		58	42	39	37
ζ			34	38	37
β				73	75
γ					80

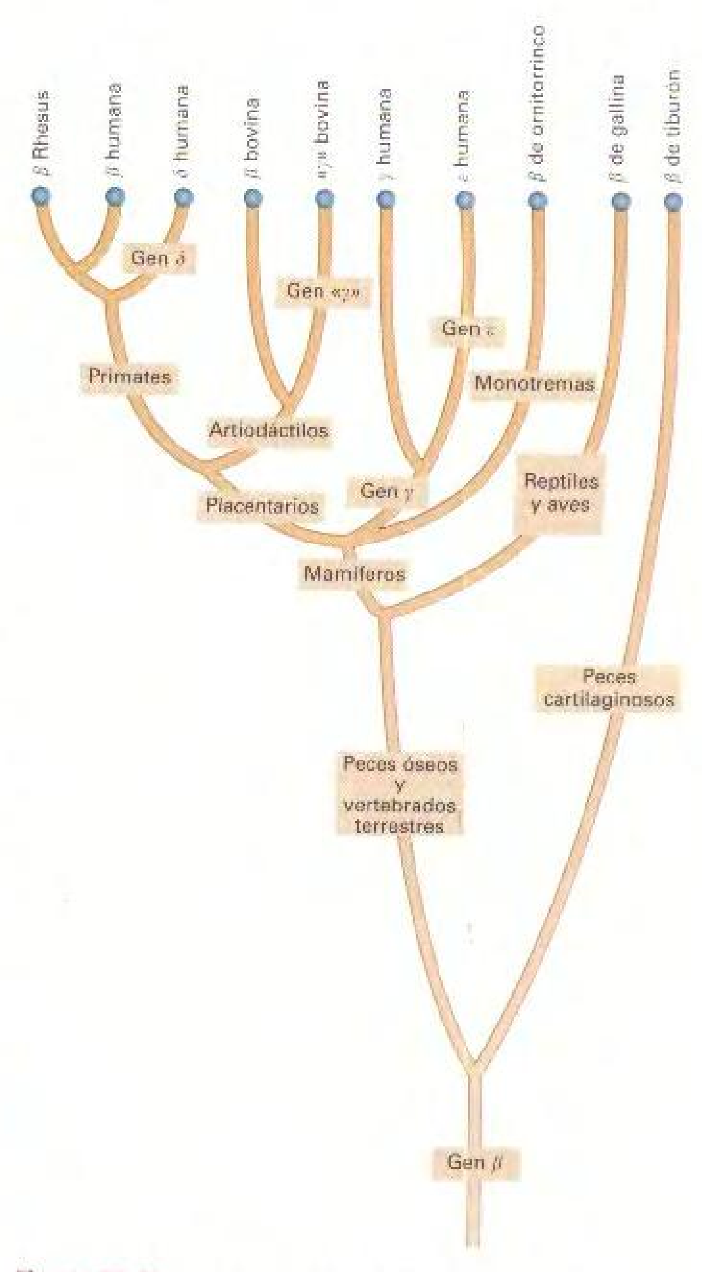


Figura 26-15. Reconstrucción de la diversificación de la familia génica de las globinas de tipo β a lo largo de la evolución de los vertebrados.

Lactoalbúmina α de cabra



Gen de la lisozima de gallina



Figura 26-16. Homología estructural entre el gen de la lisozima de gallina y la lactoalbúmina α de mamíferos. Los intrones y los exones se representan con barras de color verde oscuro y verde claro, respectivamente. Se indican las secuencias de nucleótidos al principio y al final de cada intrón, y los números hacen referencia a la longitud en nucleótidos de cada segmento (De I. Kumagai, S. Takeda y K.-I. Miura, «Functional Conversion of the Homologous Proteins α-Lactalbumin and Lysozyme by Exon Exchange», *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89, 1992, 5887-5891.)

denas α, γ, ε y ζ. Tras 10 semanas, las cadenas ε y ζ son reemplazadas por las cadenas α, β y γ. Poco antes del nacimiento, la cadena β reemplaza a la cadena γ y se produce una pequeña cantidad de una sexta globina, la δ.

El Cuadro 26-4 muestra los porcentajes de identidad de aminoácidos entre estos polipéptidos, y en la Figura 26-14 se muestra la localización cromosómica y las estructuras exón-intrón de los genes que los cifran. La relación de vínculos entre estos genes es muy coherente. Las cadenas β, δ, γ y ε pertenecen al grupo de las cadenas de «tipo β»: éstas poseen secuencias de aminoácidos muy similares, están cifradas por genes situados todos en un fragmento de 60 kb de DNA en el cromosoma 11 y presentan una distribución de exones e intrones idéntica. Las cadenas α y ζ pertenecen al grupo de «tipo α» y sus genes se encuentran en una región de 40 kb en el cromosoma 16. Dos genes adyacentes, con idéntica estructura de exones e intrones, cifran dos formas ligeramente distintas de cadena α, al igual que ocurre con dos formas distintas de cadena ζ. Además, y como se observa en la Figura 26-14, tanto en la agrupación génica del cromosoma 11 como en la del cromosoma 16 hay pseudogenes, denominados como Ψ_α y Ψ_β. Estos pseudogenes son copias duplicadas que no adquirieron nuevas funciones, sino que acumularon mutaciones hasta convertirse en secuencias no funcionales. En cada momento del desarrollo, las moléculas de hemoglobina están compuestas de dos cadenas de «tipo α» y dos cadenas de «tipo β», pero los miembros específicos de ambos grupos cambian en las etapas embrionaria, fetal y tras el nacimiento. Lo que es aún más destacable es que el orden de los genes en cada cromosoma se corresponde con el orden temporal de aparición de las cadenas de globina en el curso del desarrollo. Esta complejidad de recambios de diferentes cadenas de globinas surgió por evolución en los mamíferos y no aparece ni en los peces, ni en los anfibios, ni en los reptiles, ni en las aves, ni incluso en los monotremas, que poseen únicamente un sistema básico con cadenas α y β. La Figura 26-15 muestra el orden de aparición, a lo largo de la evolución, de los diferentes componentes del sistema de «tipo β».

En la evolución de la hemoglobina, el DNA duplicado cifra una función íntimamente relacionada con la determinada por el gen original que experimentó la duplicación. La otra posibilidad en la evolución del DNA duplicado es alcanzar una divergencia completa de función. Un ejemplo de tal divergencia se expone en la Figura 26-16. Las aves y los mamíferos, como todos los organismos eucarióticos, tienen un gen que cifra la lisozima, un enzima protector que degrada la pared celular de las bacterias. Este gen se duplicó en el linaje de los mamíferos y dio lugar a una segunda secuencia que cifra una proteína completamente diferente, incluso no enzimática, la α-lactoalbúmina. La Figura 26-16 muestra cómo el gen surgido por duplicación tiene la misma estructura de exones e intrones que el gen de la lisozima, cuya propia disposición en cuatro exones y tres intrones sugiere diversos hechos de duplicación anteriores, durante el origen de la lisozima.

CUADRO 26-5. Comparación del código universal del DNA nuclear con diversos códigos mitocondriales en relación a seis tripletes en los que difieren

	CÓDIGO DE TRIPLETES				
	TGA	ATA	AGA	AGG	AAA
Nuclear	Stop	Ile	Arg	Arg	Lys
Mitocondrial					
Mamíferos	Trp	Met	Stop	Stop	Lys
Aves	Trp	Met	Stop	Stop	Lys
Anfibios	Trp	Met	Stop	Stop	Lys
Equinodermos	Trp	Ile	Ser	Ser	Asn
Insectos	Trp	Met	Ser	Stop	Lys
Nematodos	Trp	Met	Ser	Ser	Lys
Platelmintos	Trp	Met	Ser	Ser	Asn
Cnidarios	Trp	Ile	Arg	Arg	Lys

DNA importado

El nuevo DNA, como base para la elaboración de nuevas funciones, no sólo surge como resultado de la duplicación de DNA en un punto cromosómico adyacente. En muchas ocasiones, se ha importado al genoma DNA extra de diversas fuentes y por variados mecanismos distintos a la reproducción sexual. El DNA que

se puede insertar en los cromosomas puede proceder de otras localizaciones cromosómicas y de otras especies. Se pueden incorporar genes de organismos muy alejados evolutivamente. Este material, una vez incorporado al genoma de la célula, pasa a formar parte de su herencia y función.

Orgánulos celulares. Las células eucarióticas contienen orgánulos celulares como las mitocondrias o los cloroplastos de los organismos fotosintéticos. Ambos tipos de orgánulos son descendientes de procariotas que penetraron en las células eucarióticas, bien por infección, bien por ingestión. Estos procariotas se convirtieron en simbiontes, transfiriendo la mayor parte de su material genético al núcleo de la célula hospedadora eucariótica, aunque retuvieron genes esenciales para las funciones celulares. Las mitocondrias han retenido alrededor de tres docenas de genes implicados en la respiración celular así como algunos genes de tRNA, mientras que los genomas de los cloroplastos poseen unos 130 genes que cifran enzimas del ciclo fotosintético junto con genes de proteínas ribosómicas y de tRNA.

Una evidencia muy importante sobre el origen extracelular de las mitocondrias se encuentra en su código genético. El código «universal» de los genes nucleares no es, de hecho, universal y difiere en algunos aspectos del código genético de las mitocondrias. El Cuadro 26-5 indica que, en 6 de los 64 tripletes de RNA, las mitocondrias difieren en su código del código del genoma nuclear. Pero es más, las mitocondrias de diferentes organismos difieren entre sí en estos elementos del código, lo que proporciona una evidencia de que la invasión de las células eucarióticas debió haber ocurrido no menos de cinco veces, una por cada procariota con un código distinto. En los vertebrados, los gusanos y los insectos, el código mitocondrial es más regular que el código universal nuclear. En el genoma nuclear, la isoleucina es el único aminoácido que está determinado de forma redundante por tres codones, estando la metionina cifrada por el cuarto miembro del grupo de codones, separada por una transición de A a G; mientras que en la mitocondria hay dos metioninas separadas por una transversión de las dos isoleucinas de este grupo.

Transferencia horizontal. Ahora resulta obvio que el genoma nuclear se encuentra abierto a la inserción tanto de otras partes del genoma como de fuentes exógenas (véase el Cap. 20). Los cromosomas de un individuo de *Drosophila*, por ejemplo, contienen una gran diversidad de familias de elementos transponibles con múltiples copias de cada uno de ellos distribuidas por todo el genoma. Hasta el 25 % del genoma puede estar constituido por elementos transponibles en su origen. No está claro por ahora qué papel desempeña en la evolución este DNA móvil. La transposición que tiene lugar cuando se introducen elementos transponibles en los cigotos durante el apareamiento, como con los elementos *P* de *Drosophila*, resulta en una proliferación explosiva de estos elementos en el genoma receptor. Cuando se inserta un elemento móvil en un gen, la mutación originada normalmente tiene un efecto deletéreo drástico sobre el organismo, pero este efecto podría ser un artefacto de los métodos empleados en el laboratorio para detectar la presencia de tales elementos. Los experimentos de selección en el laboratorio sobre caracteres cuantitativos han demostrado que la transposición puede actuar como una fuente añadida de variación seleccionable. Por último, existe la posibilidad de que se transfieran genes desde el genoma nuclear de una especie al genoma nuclear de otra mediante el fenómeno de la retrotransposición mediada por retrovirus (véase el Cap. 20). Esta posibilidad podría constituir una poderosa vía de adquisición de nuevas funciones por parte de una especie. Los retrovirus podrían ser transportados entre especies muy distantes por vectores de enfermedades corrientes como los insectos, o a través de las infecciones bacterianas.

Relación entre cambio genético y cambio funcional

No existe una relación simple entre la tasa de cambio que experimenta el DNA y la magnitud del cambio funcional que experimenta la proteína cifrada. En un extremo, se puede reemplazar casi toda la secuencia aminoacídica de una proteína y mantener ésta la misma función. Los eucariotas, desde las levaduras a nuestra especie, producen una enzima, la lisozima, que degrada la pared bacteriana. Durante la divergencia evolutiva que ha tenido lugar entre las levaduras y los vertebrados desde su separación en linajes separados, prácticamente no se ha mantenido ningún aminoácido común en ambas lisozimas; por consiguiente el alineamiento de las dos proteínas, o de la secuencia de DNA, no revela ninguna similitud. La evidencia de que derivan de un gen ancestral común la proporcionan las comparaciones con formas intermedias desde el punto de vista evolutivo, las cuales muestran cada vez mayor divergencia a medida que las especies se van separando en el árbol filogenético. El mantenimiento de la función, a pesar de la sustitución de los aminoácidos, se debe al mantenimiento de la estructura tridimensional de la enzima por medio de sustituciones selectivas que permiten sólo el cambio por un aminoácido adecuado para mantener la conformación.

Por contra, es posible cambiar la función de una enzima mediante una única sustitución aminoacídica. *Lucilla cuprina*, una mosca relacionada con una enfermedad del ganado ovino, ha desarrollado resistencia a los insecticidas organofosforados que se han utilizado intensamente para combatirla. R. Newcombe, P. Cambell y sus colaboradores demostraron que esta resistencia es la consecuencia de una sustitución única de una glicina por un ácido aspártico en el centro activo de una enzima que normalmente funciona como una estearasa de carboxilo. La mutación causa la pérdida completa de la actividad estearasa de carboxilo, que es reemplazada por una especifidad esterasa de más amplio espectro. Un modelo tridimensional de la molécula indica que el cambio es el resultado de la capacidad de la proteína modificada para unir una molécula de agua cerca del lugar de anclaje del compuesto organofosforado, que es hidrolizado.

COROLARIO

No existe una relación directa entre la cantidad de cambios en el DNA a lo largo de la evolución y la magnitud del cambio funcional que produce.

Cuando se requiere más de una mutación para crear una función nueva, puede ser crítico el orden en que tienen lugar esas mutaciones. B. Hall cambió de función un gen de *E. coli* experi-

mentalmente mediante sucesivas mutaciones y un proceso de selección. En *E. coli*, además del gen normal para la actividad de fermentación de la lactosa, *lacZ*, existe otro gen estructural, *ebg*, que especifica otra β-galactosidasa que no fermenta la lactosa pero que es inducida por ella. Se desconoce la función natural de este segundo gen. Hall pudo mutar y seleccionar este gen extra posibilitando que *E. coli* creciera, sin ninguna lactosa, sobre un sustrato completamente nuevo, el galactobionato. Para hacer esto, primero debió mutar la secuencia reguladora de *ebg* para convertirlo en un gen constitutivo y ya no hiciera falta inducir su expresión mediante lactosa. Después, trató de seleccionar mutantes que fermentaran el lactobionato, pero no tuvo éxito. Primero era necesario seleccionar una forma que fuera capaz de fermentar un sustrato relacionado, la lactulosa, y entonces pudo mutagenizar los fermentadores de lactulosa y seleccionar aquellos que fermentaran el lactobionato. Además, sólo algunos de los mutantes independientes que podían fermentar la lactulosa pudieron ser mutados de nuevo y seleccionados para actuar sobre el lactobionato. Los otros supusieron callejones sin salida. Por tanto, la secuencia de la evolución debió ser (1) desde una enzima inducible a otra constitutiva, seguido de (2) precisamente la mutación de la utilización de lactosa a la utilización de lactulosa y, por último, (3) una mutación para fermentar el lactobionato.

COROLARIO

En la evolución de nuevas funciones por mutación y selección, hay rutas concretas que deben seguir las distintas mutaciones necesarias para el cambio. Otras rutas desembocan en callejones sin salida que no permiten una evolución posterior.

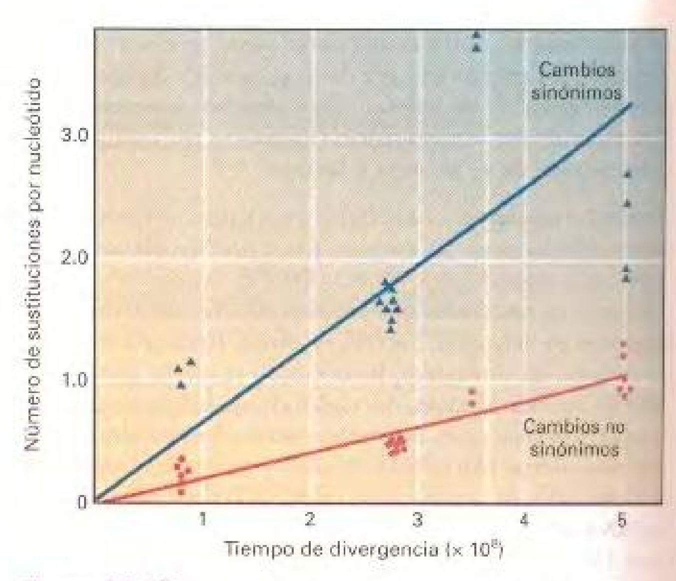


Figura 26-17. Grado de divergencia en la secuencia de nucleótidos del gen de la β-globina, tanto en lugares donde se producen cambios sinónimos como en lugares donde se producen cambios no sinónimos, en función del tiempo transcurrido desde que comenzó la divergencia.

Tasa de evolución molecular

Aunque es posible que sólo una o unas pocas mutaciones originen un cambio en la especificidad de una proteína, la situación más normal es que el DNA acumule sustituciones durante largos períodos de evolución sin hacer un cambio cualitativo en las propiedades funcionales de la proteína que cifra. Pueden darse, sin embargo, pequeños efectos que influyan sobre las propiedades cinéticas de la proteína cifrada, la cantidad producida o el ritmo de producción, lo que afectará a la aptitud biológica del organismo. Las mutaciones en el DNA pueden tener tres efectos sobre la aptitud biológica. Primero, pueden ser deletéreas, reduciendo la probabilidad de supervivencia y reproducción de sus portadores. Todos los mutantes de laboratorio usados por los genetistas experimentales presentan algún efecto deletéreo sobre la aptitud biológica. Segundo, pueden aumentar la aptitud biológica al proporcionar una mayor eficacia o aumentar el rango de condiciones ambientales en las que puede vivir la especie, o posibilitando que el organismo perciba cambios en el medio. Tercero, las mutaciones pueden no tener efecto alguno sobre la aptitud biológica, dejando inalteradas la probabilidad de supervivencia y reproducción del organismo; se trata entonces de las llamadas mutaciones neutras. Sin embargo, con objeto de entender mejor el concepto de tasa de evolución molecular, necesitamos hacer una pequeña distinción entre mutaciones *efectivamente neutras* y *efectivamente seleccionadas*. En el Capítulo 24 aprendimos que, en una población finita de N individuos, el proceso de deriva genética aleatoria no se verá alterado si la intensidad de la selección sobre un alelo, s, es inferior a $1/N$. Eso significa que la categoría de mutaciones evolutivamente neutras incluye tanto las que no tienen ningún efecto sobre la aptitud biológica como aquellas cuyos efectos sobre la aptitud biológica son inferiores a la inversa del tamaño de la población, tan pequeños como para que las mutaciones sean neutras.

Nos gustaría saber en qué medida la evolución molecular es consecuencia de nuevas mutaciones adaptativas que se van acumulando en una especie, según el esquema de una visión simplista de la evolución darwiniana, y cuánta de esta evolución molecular es sencillamente la acumulación de fijaciones aleatorias de mutaciones efectivamente neutras. No hace falta considerar las mutaciones que son efectivamente deletéreas, porque se mantendrán con muy baja frecuencia en las poblaciones y no contribuirán al cambio evolutivo. Como se explicó en el Capítulo 24, si surge una mutación nueva y es efectivamente neutra, hay una probabilidad de $1/(2N)$ de que sustituya al alelo que había previamente por acción de la deriva genética aleatoria. Si la tasa de aparición en un locus de nuevas mutaciones efectivamente neutras por copia génica y por generación es μ, entonces el número total de nuevas copias alélicas mutantes que aparecerá en una población de N individuos diploides será $2N\mu$. Cada una de estas nuevas copias tiene una probabilidad de $1/(2N)$ de establecerse en la población. Por tanto en un locus, la tasa absoluta de sustitución de alelos por generación es la tasa de aparición de los alelos nuevos, multiplicada por la probabilidad de que cualquiera de ellos se fije ocasionalmente a causa de la deriva genética.

$$\text{Tasa de sustitución neutra} = 2\,N\mu \times 1/(2N) = \mu$$

Es decir, esperamos que en cada generación haya μ sustituciones de un alelo «antiguo» por otro nuevo en cada locus de la pobla-

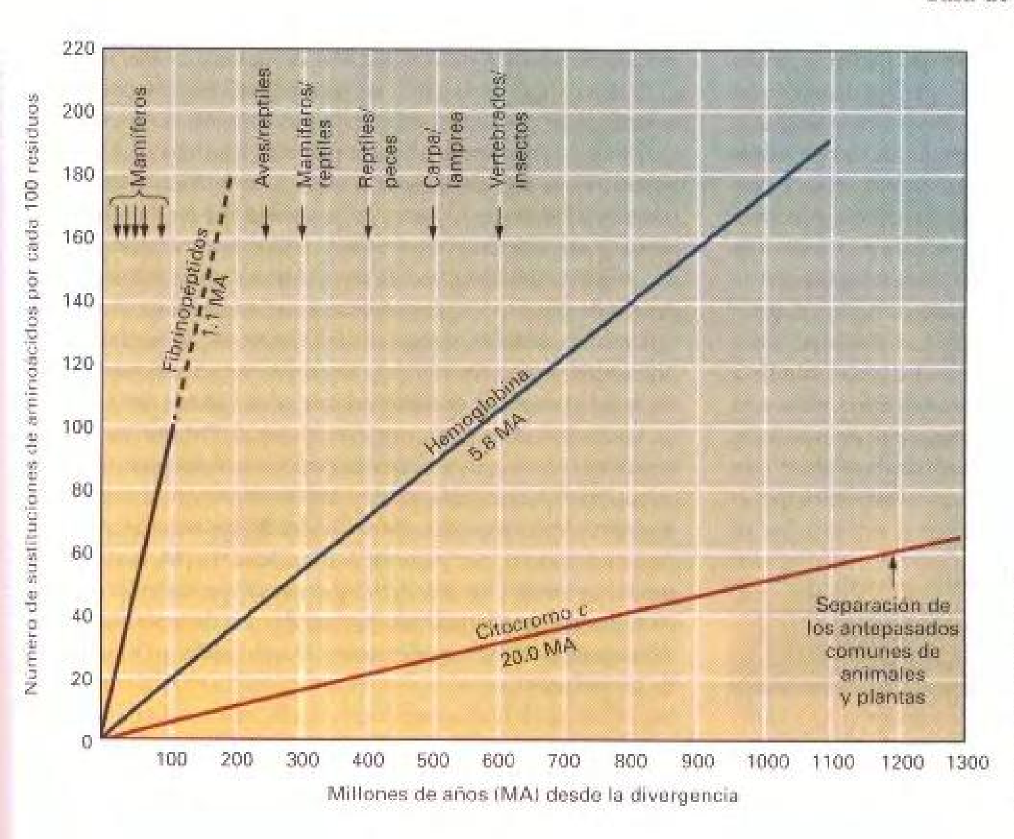


Figura 26-18. Número de sustituciones de aminoácidos en la evolución de los vertebrados en función del tiempo transcurrido desde el comienzo de la divergencia. Las tres proteínas, fibrinopéptidos, hemoglobina y citocromo *c*, difieren en sus tasas de cambio ya que son distintas las proporciones de sus aminoácidos que han sido objeto de sustituciones selectivamente neutras.

ción, exclusivamente a causa de la deriva genética aleatoria de mutaciones efectivamente neutras.

COROLARIO

La tasa de sustitución evolutiva que resulta de la deriva genética aleatoria de mutaciones efectivamente neutras es igual a la tasa de mutación hacia esos alelos, μ.

La tasa constante de mutaciones neutras predice que, si se representa frente al tiempo, desde su divergencia a partir de un ancestro común, el número de diferencias nucleotídicas entre dos especies, el resultado debería ser una línea recta con una pendiente igual a μ. Es decir, la evolución actuaría según un **reloj molecular** que funciona con un ritmo igual a la tasa μ. En la Figura 26-17 se observa una de estas gráficas para el gen de la β-globina. Los resultados son muy consistentes con la idea de que las sustituciones de nucleótidos durante los últimos 500 millones de años han sido efectivamente neutras. Se representan dos clases de sustituciones de nucleótidos: **sustituciones sinónimas**, las que producen cambios de un codón alternativo a otro que determina el mismo aminoácido; y **sustituciones no sinónimas**, que originan cambios de aminoácidos. En la Figura 26-17 se observa una pendiente mucho menos pronunciada para las sustituciones no sinónimas que para los cambios sinónimos, lo que significa que la tasa de mutación hacia sustituciones no sinónimas es mucho menor que la tasa de mutación hacia sustituciones sinónimas. Esto es precisamente lo que esperamos. La tasa de mutación hacia alelos neutros, μ, es el producto de la tasa de mutación nucleotídica intrínseca, M, y la proporción de todas las mutaciones que son neutras, f. Es decir,

$$\mu = M \times f$$

Es razonable que las mutaciones que causan la sustitución de un aminoácido tengan más frecuentemente un efecto nocivo, s, por encima del umbral de la evolución neutra y, por lo tanto, la proporción de cambios neutros, f, será menor. Merece la pena destacar que estas observaciones no demuestran que *no* existan restricciones selectivas sobre los cambios sinónimos; más bien lo que indican es que estas restricciones no son, por término medio, tan fuertes como para los cambios que originan sustituciones de aminoácidos. De hecho, los cambios sinónimos pueden tener efectos sobre el procesamiento correcto de un intrón, sobre la estabilidad y vida media de un mRNA, sobre la utilización por parte del aparato de traducción del conjunto de moléculas de tRNA disponibles y, por tanto, en la tasa de traducción y en el plegamiento del polipéptido.

CUADRO 26-6. Polimorfismos sinónimos y no sinónimos, y diferencias entre especies en la enzima alcohol deshidrogenasa en tres especies de *Drosophila*

	Diferencias entre especies	Polimorfismos
No sinónimos	7	2
Sinónimos	17	42
Cociente	0.29 : 0.71	0.05 : 0.95

Fuente: datos de J. McDonald y M. Kreitman.

Otra predicción de la evolución neutra es que distintas proteínas tendrán relojes moleculares con velocidades distintas, ya que la función metabólica de algunas proteínas será mucho más sensible a los cambios de secuencia aminoacídica. Las proteínas en las que cada aminoácido desempeña una función crítica presentarán valores inferiores de la tasa de mutaciones efectivamente neutras, *Mf*, que en el caso de proteínas que sean más tolerantes frente a las sustituciones. En la Figura 26-18 se muestra una comparación de los relojes moleculares de los fibrinopéptidos, la hemoglobina y el citocromo *c*. Los fibrinopéptidos representan meramente un sistema de seguridad no metabólico, tras la liberación por digestión del fibrinógeno, para activar la reacción de coagulación sanguínea, por tanto parece razonable que tengan una mayor proporción de mutaciones neutras. No es tan obvio por qué las hemoglobinas son menos sensibles que el citocromo *c* a los cambios de aminoácidos.

COROLARIO

La tasa de evolución neutra para la secuencia de aminoácidos de una proteína depende de la sensibilidad de la función de dicha proteína frente a los cambios de aminoácidos.

La demostración de la existencia de un reloj molecular apoya el hecho de que la mayoría de las sustituciones de nucleótidos sean neutras, pero no nos dice qué proporción de la evolución molecular es adaptativa. Una forma de identificar la evolución adaptativa de una proteína es comparar los polimorfismos sinónimos y no sinónimos dentro de la especie con los cambios sinónimos y no sinónimos entre especies. Con la evolución por deriva genética aleatoria en funcionamiento, los polimorfismos dentro de una especie representan simplemente una etapa en la fijación ocasional de un nuevo alelo; por tanto, el cociente entre polimorfismos no sinónimos y sinónimos en una especie debiera ser igual al cociente de sustituciones no sinónimas frente a sustituciones sinónimas entre especies distintas. Por otro lado, si los cambios de aminoácidos entre especies son debidos a una selección adaptativa positiva, debería haber un exceso de cambios no sinónimos entre especies. En el Cuadro 26-6 vemos la aplicación de este principio, por parte de J. MacDonald y M. Kreitman, al gen de la alcohol deshidrogenasa en tres especies muy cercanas de *Drosophila*. Claramente, hay un exceso de sustituciones de aminoácidos en las especies sobre lo que cabría esperar a partir de los polimorfismos.

RESUMEN

La teoría darwiniana de la evolución es un planteamiento basado en la variación, que explica los cambios que se dan en las poblaciones de organismos como el resultado de los cambios que se producen en las frecuencias relativas de las diferentes variantes de la población. Los procesos que generan la variación en la población son independientes de los procesos responsables de la reproducción diferencial de los distintos tipos. Se hace referencia a esta independencia cuando se dice que las mutaciones ocurren al «azar». El proceso de mutación suministra variación sin ninguna finalidad concreta, mientras que el proceso de selección filtra esta variación, aumentando la frecuencia de aquellas variantes que por casualidad están más favorecidas para sobrevivir y reproducirse. Muchos son los llamados, pero pocos los elegidos. Así, si no hay variación en la especie para algún carácter no puede haber evolución. Además, esa variación debe tener un sustrato genético. Si las diferencias no son heredables, no pueden evolucionar, ya que la reproducción diferencial de las distintas variables no se mantendrá en linajes generacionales. Por tanto, cualquier hipótesis de reconstrucción evolutiva depende de manera crítica de si los caracteres a estudio son en verdad heredables.

La divergencia evolutiva de las poblaciones en el espacio y en el tiempo no es sólo una consecuencia de la selección natural. La selección natural no es un proceso optimizador de carácter general que logra el «mejor» organismo para un medio ambiente concreto. Por el contrario, obtiene una solución de entre una serie de «buenas» soluciones alternativas frente a los problemas adaptativos. El resultado concreto de la evolución por selección en un caso particular es fruto de acontecimientos históricos casuales. Los factores aleatorios, como la deriva genética o la aparición o pérdida de nuevas mutaciones al azar, pueden producir resultados completamente distintos en un mismo proceso evolutivo, incluso aunque la intensidad de la selección natural sea la misma. La metáfora que se emplea habitualmente es la de un «paisaje adaptativo» de combinaciones genéticas donde la selección natural dirige a la población a una «cima» adaptativa en tal paisaje, pero sólo a una de las diversas cimas que hay en el paisaje.

La gran diversidad de formas de vida distintas que han existido son consecuencia de historias evolutivas independientes que han tenido lugar en poblaciones separadas. Para que distintas poblaciones diverjan unas de otras no deben intercambiar genes; por tanto, la evolución independiente de un gran número de especies requiere que esas especies estén aisladas reproductivamente unas de otras. De hecho, definimos una especie como una población de organismos que intercambia genes en su seno, pero se encuentra aislada reproductivamente con respecto a otras poblaciones. Los mecanismos de aislamiento reproductivo pueden ser precigóticos o poscigóticos. Los mecanismos de aislamiento precigótico son los que impiden la unión de los gametos de dos especies. Estos mecanismos se pueden basar en incompatibilidades de conducta entre los machos y las hembras de las distintas especies, diferencias en el período o el lugar de la actividad sexual, diferencias mecánicas que impiden el apareamiento o incompatibilidades fisiológicas de los propios gametos. Entre los mecanismos de aislamiento poscigótico se incluyen la incapacidad del híbrido de desarrollarse hasta la etapa adulta, y la depresión de las generaciones posteriores de genotipos recombinantes. Las diferencias genéticas responsables del aislamiento reproductivo entre especies estrechamente relacionadas se encuentran, en su mayoría, distribuidas uniformemente por todo el genoma, aunque en especies con determinación cromosómica

del sexo puede haber una concentración de genes de incompatibilidad en el cromosoma sexual.

Si las nuevas funciones que crea la evolución no aparecen a costa de la pérdida de otras funciones preexistentes, se requiere nuevo DNA disponible para la evolución de los nuevos genes adicionales. Este DNA nuevo puede surgir por duplicación del genoma completo, por poliploidía, seguido de una lenta divergencia evolutiva del complemento cromosómico extra. Esto ha ocurrido frecuentemente en el mundo vegetal. Una alternativa es la duplicación de genes individuales seguido de selección y diferenciación. Otra fuente adicional de DNA, descubierta recientemente, es la entrada en el genoma de DNA procedente de organismos alejados filogenéticamente mediante infección y posterior integración del DNA foráneo en el genoma nuclear, o por la formación de orgánulos extranucleares con sus propios genomas. Los cloroplastos y las mitocondrias de organismos superiores han surgido de esta forma.

No toda la evolución está impulsada por las fuerzas selectivas de la naturaleza. Si la diferencia selectiva entre dos variantes genéticas es lo suficientemente pequeña, menos de la inversa del tamaño de la población, se puede producir la sustitución de un alelo por otro nuevo exclusivamente por acción de la deriva genética aleatoria. La sustitución de una secuencia proteica por otra diferente pero de función equivalente parece dar cuenta de una gran parte de la evolución molecular. La prueba de esta evolución neutra es que el número de aminoácidos diferentes en la misma molécula en dos especies diferentes (por ejemplo, la hemoglobina) es directamente proporcional al número de generaciones que han transcurrido desde que ambas especies se separaron a partir de un antepasado común. Un «reloj molecular» así, con una tasa de cambio constante, no sería posible si la selección de las diferencias dependiera de cambios concretos del medio ambiente. Además, es de esperar que dicho reloj corra más deprisa para proteínas como los fibrinopéptidos, en las que la composición aminoacídica no es esencial para su función, y de hecho se observan este tipo de diferencias en el ritmo de avance del reloj molecular. Por tanto, no podemos asegurar, si carecemos de pruebas, que los cambios evolutivos sean el resultado de una adaptación por selección natural.

En resumen, la evolución genética es un proceso histórico sujeto a circunstancias históricas y al azar, pero restringido por la necesidad de los organismos de sobrevivir y reproducirse en un mundo en constante cambio.

Mapa de conceptos

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

mutación / efecto fundador / especie / cima adaptativa alternativa / migración / aislamiento reproductivo / deriva genética / raza geográfica / selección natural / esterilidad del híbrido / evolución neutra

Problema de integración de capítulos

Un entomólogo que estudia insectos que se alimentan de la vegetación en estado de putrefacción ha descubierto un caso interesante de diversificación del jején de las setas en distintas islas de un mismo archipiélago. Cada isla tiene una población de jejenes extraordinariamente similar en morfología, aunque no idéntica, a las de otras islas, pero cada una vive sobre un tipo diferente de vegetación en putrefacción que no se encuentra en las otras islas. El entomólogo postula que se trata de especies estrechamente emparentadas que se han diferenciado adaptándose a alimentarse de sustratos ligeramente distintos.

Para apoyar esta hipótesis, lleva a cabo un estudio electroforético de la enzima alcohol deshidrogenasa de las distintas poblaciones. Descubre que cada población se caracteriza por una forma electroforética distinta de la alcohol deshidrogenasa, razonando entonces que cada una de estas formas de la enzima está adaptada específicamente a alcoholes concretos que se producen durante la fermentación de cada tipo particular de vegetación en cada isla. Además, dentro de cada isla hay algún polimorfismo, pero la frecuencia de estos alelos variantes es baja, por lo que se puede explicar su presencia como el resultado de mutaciones ocasionales o de migraciones infrecuentes desde otra isla. Los jejenes de las setas se convierten en un ejemplo de libro de texto acerca de cómo la diversidad de especies puede surgir por selección natural y adaptación a diferentes condiciones ambientales.

Una genetista de poblaciones excéptica lee el caso en el libro de texto y le surgen dudas de inmediato. A ella le parece que, según todos los indicios, una explicación igualmente plausible es que no se trata en absoluto de especies distintas, sino sólo de razas geográficas locales que se han diferenciado ligeramente en su morfología por efecto de la deriva genética aleatoria. Además, las distintas formas de la proteína alcohol deshidrogenasa podrían ser variantes fisiológicamente equivalentes de un gen que experimenta una evolución molecular neutra en las distintas poblaciones aisladas.

Diseñe una estrategia de investigación con la que se pueda distinguir entre ambas explicaciones alternativas. ¿Cómo se podría comprobar si las diversas poblaciones son o no especies distintas? ¿Cómo se podría verificar la hipótesis de que las distintas formas de la alcohol deshidrogenasa se han diferenciado por selección natural?

♦ Solución ♦

Para examinar el grado de distinción de las diferentes poblaciones de jejenes, es necesario poder manipularlos y criarlos en cautividad. Si no se pueden criar en el laboratorio o en un invernadero, no se puede establecer el grado de diversificación de la especie. Se puede examinar la compatibilidad del comportamiento sexual de los distintos grupos, colocando una mezcla de machos de dos poblaciones diferentes con hembras de una de ellas, y comprobando si existe alguna preferencia de apareamiento en las hembras. Se puede repetir este mismo experimento con una mezcla de hembras y una sola categoría de machos, y con mezclas de machos y hembras de dos clases. A partir de pruebas como éstas, se pueden establecer modelos de preferencia en el apareamiento. Aun cuando haya una pequeña proporción de apareamiento entre diferentes formas de jején, se podría atribuir a las condiciones no naturales en que se ha llevado a cabo el experimento. Por otra parte, podría ocurrir que no tuviera lugar ningún tipo de apareamiento, incluso entre miembros de la misma clase, porque falte alguna señal de apareamiento necesaria, en cuyo caso no se podría concluir nada.

Si los apareamientos entre las diversas formas tuvieran lugar, se podría comparar la supervivencia de los híbridos entre poblaciones con la de los descendientes de los cruzamientos entre miembros de la misma población. Si los híbridos sobrevivieran, se podría evaluar su fertilidad tratando de llevar a cabo retrocruzamientos con las dos estirpes parentales. Igual que con la comprobación de preferencias de apareamiento, podría ser posible cierto grado de supervivencia o fertilidad de los híbridos en las condiciones no naturales de laboratorio o invernadero, aunque el aislamiento en la naturaleza sea completo. Una reducción evidente en la supervivencia o en la fertilidad de los híbridos sería un poderoso indicio de que ambas estirpes parentales pertenecen a especies diferentes.

Para examinar si las distintas secuencias aminoacídicas que subyacen bajo las diferentes movilidades electroforéticas son la consecuencia de una divergencia selectiva, haría falta secuenciar todos los alelos del locus de la alcohol deshidrogenasa. Habría que obtener muestras de las secuencias *Adh* de cada isla. El número de secuencias *Adh* procedentes de cada isla dependerá del grado de polimorfismo presente en cada población, pero los resultados obtenidos del estudio de muchos loci en muchas especies parece indicar que, como regla general, se deberían obtener al menos 10 secuencias de cada población. Las posiciones polimórficas de la población se clasifican como no sinónimas (a) y sinónimas (b). Las diferencias fijadas entre poblaciones también se clasifican en no sinónimas (c) y sinónimas (d). Si las diferencias observadas entre las poblaciones son simplemente el resultado de la deriva genética aleatoria, entonces esperaríamos que a/b fuera igual a c/d. Si, por el contrario, hubiera tenido lugar una divergencia selectiva, habría un exceso de diferencias no sinónimas fijadas en las distintas poblaciones, por lo que a/b debiera ser menor que c/d. La relación de estos cocientes se puede comprobar mediante una prueba de contingencia de χ^2:

	POLIMORFISMOS	
	No sinónimos	Sinónimos
DIFERENCIAS DE LA POBLACIÓN	a	b
	c	d

$$\chi^2 = \frac{(a+b+c+d)(ad-bc)^2}{(a+c)(b+d)(a+b)(c+d)}$$

PROBLEMAS RESUELTOS

1. Dos especies estrechamente emparentadas se hallan fijadas en dos alelos distintos, detectables mediante electroforesis, de un locus responsable de la aparición de una enzima. ¿Cómo se podría demostrar que esta divergencia es el resultado de la acción de la selección natural y no de la evolución neutra?

♦ Solución ♦

a. Se deben obtener secuencias de DNA del gen procedentes de distintos individuos o estirpes de cada una de las dos especies. Sería aconsejable obtener diez o más secuencias de cada especie.

b. Luego, hay que clasificar las diferencias de nucleótidos entre los individuos de la misma especie (*polimorfismos*), y clasificar estas diferencias en las que originan cambios de aminoácidos (polimorfismos de sustitución) y las que no cambian el aminoácido (polimorfismos sinónimos).

c. A continuación, hay que llevar a cabo la misma clasificación de cambios sinónimos y de sustituciones entre especies, teniendo en cuenta sólo aquellas diferencias que aparecen exclusivamente entre las especies. Es decir, no se debe contabilizar un polimorfismo en una especie que incluya una variante observada en la otra especie.

d. Si el cociente entre las diferencias de sustitución respecto a las diferencias de cambios sinónimos entre especies es mayor que el mismo cociente dentro de cada especie, entonces debemos pensar en cambios de sustitución aminoacídica debidos a la selección natural.

e. Hay que verificar si dicho cociente es estadísticamente significativo mediante una prueba de contingencia de χ^2 como la de la tabla siguiente:

	POLIMORFISMOS	
	No sinónimos	Sinónimos
DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES	a	b
	c	d

$$\chi^2 = \frac{(a+b+c+d)(ad-bc)^2}{(a+c)(b+d)(a+b)(c+d)}$$

2. ¿Cómo se podría utilizar la evolución molecular de un grupo de proteínas distintas para obtener evidencias de la im-

portancia relativa de las distintas secuencias aminoacídicas particulares sobre la función de cada proteína?

♦ Solución ♦

Primero, hay que obtener DNA de los genes de cada proteína procedentes de una gran variedad de especies cuya divergencia a partir de un antecesor común esté bien caracterizada en el registro fósil. Luego, hay que traducir esta información a secuencias proteicas. Para cada proteína, hay que representar las diferencias de aminoácidos entre cada par de proteínas frente al tiempo de divergencia estimado para esas dos especies. La recta correspondiente a cada proteína tendrá una pendiente proporcional al grado de restricción funcional que se opone a las sustituciones de aminoácidos en esa proteína. Las proteínas con restricciones muy acusadas tendrán tasas de sustitución muy bajas, mientras que las proteínas más tolerantes frente a las sustituciones presentarán pendientes más pronunciadas.

PROBLEMAS

1. ¿Cuál es la diferencia entre un modelo de la evolución basado en la transformación y otro basado en la variación? Proponga un ejemplo en cada caso (sin incluir la teoría de Darwin de la evolución de los organismos).

2. ¿Cuáles son los tres principios en los que se fundamenta la teoría de la evolución de Darwin basada en la variación?

3. ¿Por qué la explicación mendeliana de los mecanismos de la herencia es esencial para la teoría darwiniana de la evolución por variación? ¿Cuáles serían las consecuencias para la evolución de un tipo de herencia mezclada? ¿Qué ocurriría con la evolución si los heterocigotos no segregaran exactamente el 50 % de cada uno de los dos alelos de un locus, sino que se presentara siempre un sesgo hacia uno de los dos alelos?

4. Si la tasa de mutación hacia un alelo nuevo es 10^{-5}, ¿qué tamaño deben tener las poblaciones aisladas para evitar que se diferencien por azar a causa de la frecuencia de este nuevo alelo?

5. Supongamos que cierto número de poblaciones locales de una especie tienen todas un tamaño de, aproximadamente, 10 000 individuos y que existe migración entre ellas. Supongamos, además, que estas poblaciones se formaron originalmente a partir de una gran población original con una frecuencia del alelo *A* de cierto locus igual a 0.4. Muestre mediante un croquis cuál será la distribución de las frecuencias alélicas en las diversas poblaciones locales tras 100, 1000, 5000, 10 000 y 100 000 generaciones de aislamiento.

6. Muestre los resultados para las poblaciones descritas en el problema 5 si hubiera un intercambio entre las poblaciones de inmigrantes con tasas de (**a**) un inmigrante por población cada 10 generaciones; (**b**) un inmigrante por población y por generación.

7. Supongamos que una población está segregando en dos loci con dos alelos cada uno de ellos, y que la probabilidad relativa de supervivencia de los cigotos hasta la madurez sexual es, para los nueve genotipos, la que se muestra a continuación:

	A/A	*A/a*	*a/a*
B/B	0.95	0.90	0.80
B/b	0.90	0.85	0.70
b/b	0.90	0.80	0.65

Calcule la aptitud biológica media, $\overline{W}$, de la población si las frecuencias alélicas fueran $p(A) = 0.8$ y $p(B) = 0.9$. ¿Cuál sería la dirección del cambio que se esperaría en las frecuencias alélicas de la siguiente generación? Realice el mismo cálculo y la misma predicción en el caso de que las frecuencias alélicas fueran $p(A) = 0.2$ y $p(B) = 0.2$. ¿Cuántas cimas adaptativas se puede deducir que existen a partir del examen de las aptitudes biológicas de los genotipos? ¿Cuáles serán las frecuencias alélicas en la cima o cimas adaptativas?

8. Supongamos que las aptitudes biológicas genotípicas del problema 7 fueran en realidad:

	A/A	*A/a*	*a/a*
B/B	0.9	0.8	0.9
B/b	0.7	0.9	0.7
b/b	0.9	0.8	0.9

Calcule la aptitud biológica media, $\overline{W}$, para unas frecuencias alélicas $p(A) = 0.5$ y $p(B) = 0.5$. ¿En qué dirección se esperaría que se efectuara el cambio de frecuencias alélicas de la siguiente generación? Repita cálculo y predicción para el caso de que $p(A) = 0.1$ y $p(B) = 0.1$. Del examen de las aptitudes biológicas genotípicas, ¿cuántas cimas adaptativas se pueden deducir y dónde se encuentran?

9. ¿Cuáles son las evidencias que indican que la formación de poliploides ha desempeñado un papel importante en la evolución vegetal?

10. ¿Qué indicios existen de que la duplicación génica ha sido el origen de las familias génicas α y β de las hemoglobinas humanas?

11. El alelo de grupo sanguíneo humano I^B aparece con una frecuencia de alrededor de 0.10 entre las poblaciones europeas y asiáticas pero está casi completamente ausente en las poblaciones de indios americanos. ¿Qué explicaciones podemos dar para justificar esta diferencia?

12. ¿Qué es una raza geográfica? ¿Cuál es la diferencia entre una raza geográfica y una especie distinta? ¿Bajo qué condicionamientos se convertirán en nuevas especies diferentes entre sí las razas geográficas de una misma especie?

13. *Drosophila pseudoobscura* y *D. persimilis* ahora se consideran especies distintas, pero originalmente se clasificaron

genomes of wheat and its relatives and how new genes can be introduced.

Friedmann, T. 1971. "Prenatal Diagnosis of Genetic Disease." *Scientific American* (November). An early article on amniocentesis and its uses.

Fuchs, F. 1980. "Genetic Amniocentesis." *Scientific American* (August).

German, J., ed. 1974. *Chromosomes and Cancer.* New York: Wiley. A large technical work but readable, describing the relation of chromosome changes and cancer.

Hassold, T. J., and P. A. Jacobs. 1984. "Trisomy in Man." *Annual Review of Genetics* 18: 69–98. A comprehensive summary of trisomy, including a discussion of the maternal-age effect.

Hulse, J. H., and D. Spurgeon. 1984. "Triticale." *Scientific American* (August). An account of the development and possible benefits of this wheat-rye amphidiploid.

Lawrence, W. J. C. 1968. *Studies in Biology,* no. 12: *Plant Breeding.* London: Edward Arnold. A short introduction to the subject.

Mangelsdof, P. C. 1986. "The Origins of Corn." *Scientific American* (August).

Maniatis, T. E., et al. 1980. "The Molecular Genetics of Human Hemoglobins." *Annual Review of Genetics* 14: 145–178. A useful summary, which could be profitably read at this point in the course or after reading the material on molecular genetics.

Patterson, D. 1987. "The Causes of Down Syndrome." *Scientific American* (August).

Shepherd, J. F. 1982. "The Regeneration of Potato Plants from Protoplasts." *Scientific American* (May). A review by one of the leaders in this field.

Swanson, C. P., T. Mertz, and W. J. Young. 1967. *Cytogenetics.* Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

Capítulo 19

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. 1989. *Molecular Biology of the Cell,* 2d ed. New York: Garland. See pages 239 to 248 for an excellent description of recombination at the molecular level, with nice illustrations.

Stahl, F. W. 1979. *Genetic Recombination: Thinking about It in Phage and Fungi.* New York: W. H. Freeman. A rather technical short book on recombination models.

Stahl, F. W. 1994. "The Holliday Junction on Its Thirtieth Anniversary." *Genetics* 138: 241–246. An easy-to-read review of the Holliday model and subsequent variations that are used today to explain recombination.

Whitehouse, H. L. K. 1973. *Towards an Understanding of the Mechanism of Heredity,* 3d ed. London: Edward Arnold. An excellent general introduction to genetics stressing the historical approach and the pivotal experiments. It includes a good section on recombination models.

Capítulo 20

Baltimore, D. 1985. "Retroviruses and Retrotransposons: The Role of Reverse Transcription in Shaping the Eukaryotic Genome." *Cell* 40: 481–482. A short review of work on RNA intermediates in transposition.

Berg, D. E., and M. M. Howe, eds. 1989. *Mobile DNA.* Washington, DC: American Society for Microbiology. A collection of incisive reviews on transposable elements from bacteria to humans.

Bukhari, A. I., J. A. Shapiro, and S. L. Adhya, eds. 1977. *DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. An excellent large collection of short summary papers on lower and higher life forms.

Cohen, S. N., and J. A. Shapiro. 1980. "Transposable Genetic Elements." *Scientific American* (February). A popular account stressing bacteria and phages.

Fedoroff, N. V. 1984. "Transposable Genetic Elements in Maize." *Scientific American* (June). An account of the early experiments in maize, with more recent results on the molecular basis of transposition.

Shapiro, J. A., ed. 1983. *Mobile Genetic Elements.* New York: Academic Press. A comprehensive set of reviews covering the latest developments on transposition in later prokaryotes and eukaryotes.

Capítulo 21

Borst, P., and L. A. Grivell. 1978. "The Mitochondrial Genome of Yeast." *Cell* 15: 705–723. A nontechnical review of the molecular biology of mtDNA.

Dujon, B. 1981. "Mitochondrial Genetics and Functions." In *The Molecular Biology of the Yeast* Saccharomyces, J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach, eds. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. The most comprehensive review available. This book is useful for many other aspects of yeast genetics and molecular biology.

Gillham, N. W. 1978. *Organelle Heredity.* New York: Raven Press. A rather technical work on the subject, especially strong on genetic analysis.

Griffiths, A. J. F. 1992. "Fungal Senescence." *Annual Review of Genetics* 26: 349–370. A review article that shows how most cases of fungal senescence are caused by mitochondrial mutations or mitochondrial plasmids.

Grivell, L. A. 1983. "Mitochondrial DNA." *Scientific American* (March). An excellent and up-to-date review including discussions of the unique mitochondrial translation system and of splicing of mitochondrial introns.

Linnane, A. W., and P. Nagley. 1978. "Mitochondrial Genetics in Perspective: The Derivation of a Genetic and Physical Map of the Yeast Mitochondrial Genome." *Plasmid* 1: 324–345. An excellent review of the genetics and molecular biology of yeast mtDNA.

Sager, R. 1965. "Genes Outside Chromosomes." *Scientific American* (January). A popular description of early *Chlamydomonas* experiments.

Sager, R. 1972. *Cytoplasmic Genes and Organelles.* New York: Academic Press.

Wallace, D. C. 1992. "Mitochondrial Genetics: A Paradigm for Aging and Degenerative Diseases?" *Science* 256: 628–632. A review article on the various types of mtDNA mutations in humans and their disease outcomes.

Capítulo 22

Baserga, R. 1994. "Oncogenes and the Strategy of Growth Factors." *Cell* 79: 927–930.

Bowerman, B. 1995. "Determinants of Blastoderm Identity in the Early *C. elegans* Embryo." *BioEssays* 17: 405–414.

Cavenee, W. K., and R. L. White. 1995. "The Genetic Basis of Cancer." *Scientific American* (March).

Cohen, G. B., R. Ren, and D. Baltimore. 1995. "Modular Binding Domains in Signal Transduction Proteins." *Cell* 80: 237–248.

Cox, L. S., and D. P. Lane. 1995. "Tumour Suppressors, Kinases and Clamps: How p53 Regulates the Cell Cycle in Response to DNA Damage." *BioEssays* 17: 501–508.

Draetta, G. F. 1994. "Mammalian G1 Cyclins." *Current Opinion in Cell Biology* 6: 842–846.

Edgar, B. A. 1994. "Cell–Cycle Control in a Developmental Context." *Current Biology* 4: 522–524.

Elledge, S. J., and J. W. Harper. 1994. "Cdk Inhibitors: On the Threshold of Checkpoints and Development." *Current Opinion in Cell Biology* 6: 847–852.

Fishel, R., and R. D. Kolodner. 1995. "Identification of Mismatch Repair Genes and Their Role in the Development of Cancer." *Current Opinion in Genetics and Development* 5: 382–396.

Haffner, R., and M. Oren. 1995. "Biochemical Properties and Biological Effects of p53." *Current Opinion in Genetics and Development* 5: 84–91.

Hartwell, L. H., and M. B. Kastan. 1994. "Cell Cycle Control and Cancer." *Science* 266: 1821–1828.

Jiricny, J. 1994. "Colon Cancer and DNA Repair: Have Mismatches Met Their Match?" *Trends in Genetics* 10: 164–168.

Kamb, A. 1995. "Cell-Cycle Regulators and Cancer." *Trends in Genetics* 11: 136–140.

Karin, M., and T. Hunter. 1995. "Transcriptional Control by Protein Phosphorylation: Signal Transmission from the Cell Surface to the Nucleus." *Current Biology* 5: 747–757.

como las razas A y B de una especie única. Son indistinguibles morfológicamente una de otra si exceptuamos una pequeña diferencia en el aparato genital de los machos. Cuando se cruzan en el laboratorio se produce una descendencia F_1 abundante y de ambos sexos. Describa el programa experimental que llevaría a cabo para comprobar si se trata de dos especies diferentes.

14. Utilizando los datos de similitud de secuencia aminoacídica del Cuadro 26-4 para las cadenas de globina α, β, γ, ζ y ε, y basándose en la existencia de un reloj molecular, dibuje un árbol evolutivo para estas cadenas, comenzando desde una secuencia de aminoácidos ancestral en la que el orden temporal de las ramificaciones sea tan consistente como sea posible con el grado de similitud mostrado en la tabla.

15. Los estudios de secuenciación de DNA de un gen en dos especies muy emparentadas revelan los siguientes datos sobre lugares en que varía la secuencia:

Polimorfismos sinónimos	50
Diferencias no sinónimas entre especies	2
Diferencias sinónimas entre especies	18
Polimorfismos no sinónimos	20

¿Apoyan estos resultados una evolución neutra en el gen? ¿Sugieren una sustitución adaptativa de aminoácidos? ¿Qué explicación se podría dar a la aparición de estos datos?

Apéndice

Nomenclatura genética

No hay un conjunto de reglas universalmente aceptadas para nombrar los genes, los alelos, los productos proteicos y los fenotipos asociados. Al principio, los genetistas crearon sus propios símbolos para documentar sus trabajos. Con posterioridad, grupos de personas que trabajaban en un determinado organismo se reunieron y establecieron una serie de normas de nomenclatura que todos usarían. Dado que *Drosophila* fue uno de los primeros organismos que los genetistas utilizaron profusamente, gran parte de la nomenclatura que se usa en la actualidad en otros sistemas es una variación de la empleada en esta mosca. No obstante, se ha producido una divergencia considerable. Algunos científicos abogan ahora por una normalización de esta simbología, pero la normalización está lejos de alcanzarse. De hecho, la situación se ha hecho más compleja con el advenimiento de la tecnología del DNA. Si bien la mayoría de los genes se habían denominado previamente en función de los fenotipos asociados a sus mutaciones, la nueva tecnología ha mostrado con precisión la naturaleza de los productos de muchos de estos genes. Por lo tanto, parece más apropiado referirse a ellos en base a sus funciones celulares. Sin embargo, los nombres antiguos continúan presentes en la literatura, de manera que muchos genes tienen dos formas paralelas de nomenclatura.

Los siguientes ejemplos no cubren en absoluto todos los organismos utilizados en Genética, pero la mayoría de las normas de nomenclatura sigue algunos de estos tipos.

Drosophila melanogaster (insecto)

ry	Un gen que al mutar da lugar a ojos rosy (ojos de color rosado)
ry^{502}	Un determinado alelo mutante recesivo que da lugar a ojos rosy en los homocigotos
ry^{+}	Alelo silvestre del gen *rosy*
ry	Fenotipo mutante rosy
ry^{-}	Fenotipo silvestre (ojos rojos)
RY	Producto proteico del gen *rosy*
XDH	Deshidrogenasa de xantina. Una descripción alternativa del producto proteico del gen *rosy*, nombrado en función de la enzima que cifra
D	*Dichaete*. Un gen que al mutar produce en los heterocigotos la pérdida de ciertas cerdas y la extensión lateral de las alas, y causa letalidad en los homocigotos
D^{3}	Un determinado alelo mutante del gen *Dichaete*
D^{+}	Alelo silvestre del gen *Dichaete*
D	Fenotipo mutante Dichaete
D^{-}	Fenotipo silvestre
D	(Dependiendo del contexto) producto proteico del gen *Dichaete* (una proteína de unión a DNA)

Neurospora crassa (hongo)

arg	Gen que al mutar ocasiona requerimiento de arginina en el hongo
arg-1	Un determinado gen *arg*
arg-1	Un alelo mutante no determinado del gen *arg-1*
arg-1 (1)	Un determinado alelo mutante del gen *arg-1*
$arg\text{-}1^{+}$	El alelo silvestre
arg-1	Producto proteico del gen *arg-1*
Arg^{-}	Una estirpe que no requiere arginina
Arg^{-}	Una estirpe que requiere arginina

Saccharomyces cerevisiae (hongo)

ARG	Gen que al mutar ocasiona requerimiento de arginina en la levadura
ARG1	Un determinado gen *ARG*
arg1	Un alelo mutante no determinado del gen *ARG1*
arg1-1	Un determinado alelo mutante del gen *ARG1*
$ARG1^{+}$	El alelo silvestre
ARG1p	Producto proteico del gen *ARG1*
Arg^{+}	Una estirpe que no requiere arginina
Arg^{-}	Una estirpe que requiere arginina

Homo sapiens (mamífero)

ACH	Gen que al mutar causa la acondroplasia
ACH^{1}	Un alelo mutante (dominancia no especificada)
ACH	Producto proteico del gen *ACH*; naturaleza desconocida
FGFR3	Nombre reciente para el gen de la acondroplasia
$FGFR3^{1}$ o *FGFR3**1 o *FGFR3<1>*	Alelo mutante de *FGFR3* (dominancia no especificada)
FGFR3 protein	Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos

Mus musculus (mamífero)

Tyrc	Gen para la tirosinasa
$+^{Tyrc}$	Alelo silvestre para este gen
$Tyrc^{ch}$ o *Tyrc-ch*	Alelo mutante que da lugar al color chinchilla
Tyrc	Producto proteico de este gen
+TYRC	Fenotipo silvestre
TYRCch	Fenotipo chinchilla

Escherichia coli (bacteria)

lacZ	Gen para la utilización de la lactosa

lacZ	Alelo silvestre
lacZ1	Un alelo mutante
LacZ	Producto proteico del gen
Lac$^+$	Estirpe capaz de utilizar la lactosa (fenotipo)
Lac$^-$	Estirpe incapaz de utilizar la lactosa (fenotipo)

Arabidopsis thaliana (planta)

YGR	Gen que al mutar produce hojas amarillo-verdosas
YGR1	Un determinado gen *YGR*
YGR1	El alelo silvestre
ygr1-1	Un determinado alelo mutante recesivo de *YGR1*
ygr1-2D	Un determinado alelo mutante dominante (D) de *YGR1*
YGR1	Producto proteico de *YGR1*
Ygr$^-$	Fenotipo amarillo-verdoso
Ygr$^+$	Fenotipo silvestre

McIntosh, J. R., and K. L. McDonald. 1988. "The Mitotic Spindle." *Scientific American* (October).

McLaren, A. 1988. "Sex Determination in Mammals." *Trends in Genetics* 4: 153–157.

McLeish, J., and B. Snoad. 1958. *Looking at Chromosomes.* New York: Macmillan. A short classic book consisting of many superb photographs of mitosis and meiosis.

Rick, C. M. 1978. "The Tomato." *Scientific American* (August). Includes an account of tomato genes and chromosomes and their role in breeding.

Stern, C. 1973. *Principles of Human Genetics.* 3d ed. New York: W. H. Freeman. A standard text including many examples of the inheritance of human traits.

von Wettstein, D., et al. 1984. "The Synaptonemal Complex in Genetic Segregation." *Annual Review of Genetics* 18: 331–414. An up-to-date review of the structure and function of the complex.

Capítulo 4

Bodmer, W. F., and L. L. Cavalli-Sforza. 1976. *Genetics, Evolution, and Man.* New York: W. H. Freeman. A very readable, well-illustrated book, including examples relevant to this chapter.

Griffiths, A. J. F., and F. R. Ganders. 1984. *Wildflower Genetics.* Vancouver: Flight Press. A field guide to plant variation in natural populations and its genetic basis, including examples relevant to this chapter.

Griffiths, A. J. F., and J. McPherson. 1989. *One Hundred + Principles of Genetics.* New York: W. H. Freeman. A short book that distills genetics down to its basic key concepts; useful for rapid review of the whole subject.

Hutt, W. B. 1979. *Genetics for Dog Breeders.* New York: W. H. Freeman. A short book that will make genetics immediately relevant to all dog owners and breeders.

Searle, A. G. 1968. *Comparative Genetics of Coat Color in Mammals.* New York: Academic Press. A classic treatment of the subject with many examples relevant to this and other chapters.

Silvers, W. K. 1979. *The Coat Colors of Mice.* New York: Springer-Verlag. A standard handbook on the subject, including many examples of gene interaction.

Wright, M., and S. Walters, eds. 1981. *The Book of the Cat.* New York: Summit Books. A fascinating book that has an excellent chapter on gene interaction in determining the coat colors of domestic cats.

Capítulo 5

O'Brien, S. J., ed. 1984. *Genetic Maps.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. A compendium of the detailed maps of 80 well-analyzed organisms.

Peters, J. A., ed. 1959. *Classic Papers in Genetics.* Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall. A collection of important papers in the history of genetics.

White, R., et al. 1985. "Construction of Linkage Maps with DNA Markers for Human Chromosomes." *Nature* 313: 101–104. An extension of the techniques of this chapter to DNA markers.

Capítulo 6

Finchman, J. R. S., P. R. Day, and A. Radford. 1979. *Fungal Genetics,* 3d ed. London: Blackwell. A large, standard technical work. Good for tetrad analysis.

Kemp, R. 1970. *Cell Division and Heredity.* London: Edward Arnold. A short, clear introduction to genetics. Good for map functions and tetrad analysis.

Murray, A. W., and J. W. Szostak. 1983. "Construction of Artificial Chromosomes in Yeast." *Nature* 305: 189–193. The first creation of new chromosomes by splicing together known telomere, centromere, replicator, and then DNA fragments by recombinant DNA technology. Includes tetrad analysis of markers on the new chromosomes.

Puck, T. T., and F-T. Kao. 1982. "Somatic Cell Genetics and Its Application to Medicine." *Annual Review of Genetics* 16: 225–272. A technical but readable review.

Ruddle, F. H., and R. S. Kucherlapati. 1974. "Hybrid Cells and Human Genes." *Scientific American* (July). A popular account of the use of cell hybridization in mapping human genes.

Stahl, F. W. 1969. *The Mechanics of Inheritance,* 2d ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall. A short introduction to genetics, including some advanced material presented with a novel approach.

Capítulo 7

Adelberg, E. A. 1966. *Papers on Bacterial Genetics.* Boston: Little, Brown.

Brock, T. D. 1990. *The Emergence of Bacterial Genetics.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. The definitive treatise on the beginnings and development of the field of bacterial genetics.

Hayes, W. 1968. *The Genetics of Bacteria and Their Viruses,* 2d ed. New York: Wiley. The standard and classic text, written by a pioneer in the subject.

Levy, S. B. 1998. "The Challenge of Antibiotic Resistance." *Scientific American* (March). This article shows how the different methods of gene transfer can lead to bacteria that are resistant to antibiotics.

Lewin, B. 1977. *Gene Expression,* vol. 1: *Bacterial Genomes.* New York: Wiley. An excellent set of volumes, all of which are relevant to various sections of this text.

Lewin, B. 1977. *Gene Expression,* vol. 3: *Plasmids and Phages.* New York: Wiley.

Miller, J. H. 1992. *A Short Course in Bacterial Genetics.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. A laboratory manual with extensive historical introductions to each area of bacterial genetics.

Stent, G. S., and R. Calendar. 1978. *Molecular Genetics,* 2d ed. New York: W. H. Freeman. A lucidly written account of the development of our present understanding of the subject, based mainly on experiments in bacteria and phage.

Capítulo 8

Dickerson, R. E. 1983. "The DNA Helix and How It Is Read." *Scientific American* (December). An article with some beautiful color models of DNA structures.

Greider, C. W. 1990. "Telomeres, Telomerase, and Senescence." *BioEssays* 12: 363–369. A good review written for nonexperts.

Kornberg, A., and T. Baker. 1992. *DNA Replication,* 2d ed. New York: W. H. Freeman.

Wang, J. C. 1982. "DNA Topoisomerases." *Scientific American* (July). Diagrams different topological forms of DNA.

Watson, J. D. 1981. *The Double Helix.* New York: Atheneum. An enjoyable personal account of Watson and Crick's discovery, including the human dramas.

Capítulo 9

Benzer, S. 1962. "The Fine Structure of the Gene." *Scientific American* (January). A popular version of the author's pioneer experiments.

Dressler, D., and H. Potter. 1991. *Discovering Enzymes.* New York: Scientific American Library. A delightful book that describes the discovery of enzymes and shows many of their features in well-planned easy-to-read illustrations.

Felsenfeld, G. 1985. "DNA." *Scientific American* (October).

Prusiner, S. B. 1995. "The Prion Diseases." *Scientific American* (January). A review of an article describing the fascinating phenomenon of infectious protein particles.

Radman, M., and R. Wagner. 1988. "The High Fidelity of DNA Duplication." *Scientific American* (August).

Watson, J. D., et al. 1987. *The Molecular Biology of the Gene,* 4th ed. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings. A superb development of the subject, written in a highly readable style and well illustrated.

Yanofsky, C. 1967. "Gene Structure and Protein Structure." *Scientific American* (May). This article gives the details of colinearity at the molecular level.

Capítulo 10

Chambon, P. 1981. "Split Genes." *Scientific American* (May). The discovery of intervening sequences is described.

Crick, F. H. C. 1962. "The Genetic Code." *Scientific American* (October). This article and the following one are popular accounts of code-cracking experiments.

Crick, F. H. C. 1966. "The Genetic Code: III." *Scientific American* (October).

Darnell, J. E., Jr. 1985. "RNA." *Scientific American* (October).

Doolittle, R. F. 1985. "Proteins." *Scientific American* (October).

Lake, J. A. 1981. "The Ribosome." *Scientific American* (August). Three-dimensional model of the ribosome.

Lane, C. 1976. "Rabbit Hemoglobin from Frog Eggs." *Scientific American* (August). This article describes experiments illustrating the universality of the genetic system.

Lawn, R. M., and G. A. Vehar. 1986. "The Molecular Genetics of Hemophilia." *Scientific American* (March).

Miller, O. L. 1973. "The Visualization of Genes in Action." *Scientific American* (March). A discussion of electron microscopy of transcription and translation.

Moore, P. B. 1976. "Neutron-Scattering Studies of the Ribosome." *Scientific American* (October). This article gives the details of ribosome substructure.

Nirenberg, M. W. 1963. "The Genetic Code: II." *Scientific American* (March). Another account of early code-cracking experiments.

Radman, M., and R. Wagner. 1988. "The High Fidelity of DNA Duplication." *Scientific American* (August).

Rich, A., and S. H. Kim. 1978. "The Three-Dimensional Structure of Transfer RNA." *Scientific American* (January). A presentation of the experimental evidence behind the structure described in this chapter.

Weinberg, R. A. 1985. "The Molecules of Life." *Scientific American* (October).

Capítulo 11

Hendrix, R. W., J. W. Roberts, F. W. Stahl, and R. A. Weisberg. 1983. *Lambda II.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. A series of incisive reviews about phage lambda.

Jacob, F., and J. Monod. 1961. "Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins." *Journal of Molecular Biology* 3: 318–356. A classic paper setting forth the elements of an operon and the experimental evidence.

Lewis, M., et al. 1996. "Crystal Structure of the Lactose Operon Repressor and Its Complexes with DNA and Inducer." *Science* 271: 1247–1254. The three-dimensional structure of the *lac* repressor is detailed with color diagrams that show how the repressor functions.

Maniatis, T., S. Goodbourn, and J. A. Fischer. 1987. "Regulation of Inducible and Tissue-Specific Gene Expression." *Science* 236: 1237–1244. A current review of regulatory elements in eukaryotes.

Maniatis, T., and M. Ptashne. 1976. "A DNA Operator-Repressor System." *Scientific American* (January). This article discusses the molecular structures of the components of the *lac* operon.

Miller, J. H., and W. S. Reznikoff, eds. 1980. *The Operon*, 2d ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. A valuable set of reviews on gene regulation in bacteria.

Moses, P. B., and N.-H. Chua. 1988. "Light Switches for Plant Genes." *Scientific American* (April).

Ptashne, M., and W. Gilbert. 1970. "Genetic Repressors." *Scientific American* (June). The exciting story of how repressors were identified and purified, thereby confirming the predictions of Jacob and Monod.

Steitz, J. A. 1988. "Snurps." *Scientific American* (June).

Tijan, R. 1995. "Molecular Machines That Control Genes." *Scientific American* (February). An up-to-date review of eukaryotic gene transcription regulation.

Transcription. 1991. *Trends in Biochemical Sciences* (November). A whole issue of this journal consists of reviews about eukaryotic transcription regulation.

Weber, I. T., D. B. McKay, and T. A. Steitz. 1982. "Two Helix DNA Binding Motifs of CAP Found in *lac* Repressor and *gal* Repressor." *Nucleic Acids Research* 10: 5085–5102. Discussion of models for repressor–operator recognition.

Capítulo 12

Britten, R. J., and D. Kohne. 1968. "Repeated Sequences in DNA." *Science* 161: 529–540. One of the important summaries of the theoretical basis for distinguishing DNAs by renaturation.

Broda, P. 1979. *Plasmids.* New York: W. H. Freeman. One of the few technical books on the subject.

Brown, D. D. 1973. "The Isolation of Genes." *Scientific American* (August). Illustrates the power of focusing molecular techniques on one specific locus with special properties.

Cohen, S. 1975. "The Manipulation of Genes." *Scientific American* (July). A summary of recombinant DNA techniques by one of the main innovators.

Fiddes, J. C. 1977. "The Nucleotide Sequence of a Viral DNA." *Scientific American* (December). This is a review of a landmark, the DNA sequence of an entire virus genome with an unexpected discovery.

Gilbert, W., and L. Villa-Komaroff. 1980. "Useful Proteins from Recombinant Bacteria." *Scientific American* (April). A description of the method of DNA sequencing used most extensively. Also discusses the potential application of recombinant DNA techniques.

Itakura, K., et al. 1977. "Expression in *E. coli* of a Chemically Synthesized Gene for the Hormone Somatostatin." *Science* 198: 1056–1063. A technical paper well worth reading for its historical significance. It represents the start of bioengineering — using DNA manipulation to modify cells to produce a medically useful human protein.

Khorana, H. G., et al. 1972. "Studies on Polynucleotides CIII: Total Synthesis of the Structural Gene for an Alanine Transfer Ribonucleic Acid from Yeast." *Journal of Molecular Biology* 72: 209–217. A classic technical paper.

Nathans, D., and H. O. Smith. 1975. "Restriction Endonucleases in the Analysis and Restructuring of DNA Molecules." *Annual Review of Biochemistry* 44: 273–293. A technical review of restriction enzymes by two pioneers in the field.

Sinsheimer, R. L. 1977. "Recombinant DNA." *Annual Review of Biochemistry* 46: 415–438. A provocative article by a leading molecular biologist who has expressed concern about potential hazards of DNA manipulation.

Varmus, H. 1987. "Reverse Transcription." *Scientific American* (September).

Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller. 1992. *Recombinant DNA*, 2d ed. New York: W. H. Freeman. A well-written account of recombinant DNA and its applications, with many wonderful illustrations.

Capítulo 13

Capecchi, M. R. 1994. "Targeted Gene Replacement." *Scientific American* (March). A popular article describing details of the production of knockout mice by gene replacement.

Mertens, T. R. 1975. *Human Genetics: Readings on the Implications of Genetic Engineering.* New York: Wiley. A collection of popular articles.

Moses, P. B., and N.-H. Chua. 1988. "Light Switches for Plant Genes." *Scientific American* (April).

Murray, A. W., and J. W. Szostak. 1987. "Artificial Chromosomes." *Scientific American* (November).

Ronald, P. C. 1997. "Making Rice Disease-Resistant." *Scientific American* (November). The story of how genetic engineering can improve rice crops.

Velander, W. H., H. Lubon, and W. N. Drohan. 1997. "Transgenic Livestock as Drug Factories." *Scientific American* (January). Description of how genetic engineering makes it possible to breed pigs, cows, sheep, and other animals whose milk contains large amounts of medicinal proteins.

Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller. 1992. *Recombinant DNA*, 2d ed. New York: W. H. Freeman. A well-written account of recombinant DNA and its applications, with many wonderful illustrations.

White R., and J. M. Lalouel. 1988. "Chromosome Mapping with DNA Markers." *Scientific American* (February).

Capítulo 14

Britten, R. J., and D. E. Kohne. 1970. "Repeated Segments of DNA." *Scientific American* (April).

Coulson, A., et al. 1991. "YACs and the *C. elegans* Genome." *BioEssays* 13: 413–417. A review describing the use of YACs to build up contigs for this nematode genome.

Darnell, J., H. Lodish, and D. Baltimore. 1990. *Molecular Cell Biology*, 2d ed. New York: Scientific American Books. A useful book that does a good job of translating many of the concepts of genetics into cellular processes, including a particularly strong section on chromosome structure and types of repetitive DNA.

Davidson, E., and R. Britten. 1973. "Organization, Transcription and Regulation in the Animal Genome." *Quarterly Review of Biology* 48: 565–613. The analysis of renaturation kinetics of DNA fragments is a source of insight into chromosome structure.

Fleischmann, M. D., et al. 1995. "Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae* Rd." *Science* 269: 496–512. The article reports the first full genomic sequence for a free-living organism.

Foote, S., D. Vollrath, A. Hilton, and D. C. Page. 1992. "The Human Y Chromosome: Overlapping DNA Clones Spanning the Euchroatic Region." *Science* 258: 60–66. The use of sequence-tagged sites in producing the physical map of the Y chromosome.

Green, E. D., and M. V. Olson. 1990. "Chromosomal Region of the Cystic Fibrosis Gene in Yeast Artificial Chromosomes: A Model for Human Genome Mapping." *Science* 250: 94–98. An easy-to-understand article on the principles of genome mapping with the use of YACs.

Hayashi, S., et al. 1980. "Hybridization of tRNAs of *Drosophila melanogaster*." *Chromosoma* 76: 65–84. A technical report showing how specific genes can be located cytologically by hybridization of labeled RNA to chromosomes in situ.

Jeffreys, A. J., V. Wison, and S. L. Thein. 1985. "Hypervariable 'Minisatellite' Regions in Human DNA." *Nature* 314: 67–73. One of the first papers on the subject of DNA fingerprinting.

Jeffreys, A. J., V. Wison, S. L. Thein, D. J. Weatherall, and B. A. J. Ponder. 1986. "DNA Fingerprints and Segregation Analysis of Multiple Markers in Human Pedigrees." *American Journal of Human Genetics* 39: 25–37. A technical article on the inheritance patterns of DNA fingerprints.

Meinke, D. W., et al. 1998. "*Arabidopsis thaliana:* A Model Plant for Genome Analysis." *Science* 282: 662–682.

Murray, J. C., et al. 1994. "A Comprehensive Human Linkage Map with Centimorgan Density." *Science* 265: 2049–2054. Each year *Science* publishes a genome-map issue describing progress in mapping the human genome. This issue describes the use of molecular markers and other methods for obtaining a fine-scale map of the human genome.

Scangos, A. 1997. "Drug Discovery in the Post-genomic Era." *Nature Biotechnology* 15: 1220–1221.

Walter, M., et al. 1994. "A Method for Constructing Radiation Hybrid Maps of Whole Genomes." *Nature Genetics* 7: 22–28. An easy-to-understand research paper describing the technique of radiation hybrid mapping.

Winzeler, E. A., et al. 1998. "Direct Allelic Variation Scanning of the Yeast-Genome." *Science* 281: 1194–1197.

Capítulo 15

deSerres, F. J., and A. Hollaender, eds. 1982. *Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection*, vol. 7. New York: Plenum Press. One of a set of useful volumes on this important class of mutagens particularly relevant to human mutation.

Induced Mutations: A Tool in Plant Research. 1981. Vienna: International Atomic Energy Agency. A collection of papers by eminent workers in agricultural genetics illustrating the practical uses of mutations in plant breeding.

Lawrence, C. W. 1971. *Cellular Radiobiology*. London: Edward Arnold. A short standard text.

Lindsley, D. L., and E. H. Grell. 1972. *Genetic Variations of* Drosophila melanogaster. Washington, DC: Carnegie Institute of Washington. A reference book for fruitfly researchers, containing all the thousands of known *Drosophila* mutations. Fascinating browsing for anyone interested in genetics generally and in the major contributions made by *Drosophila* research.

Neuffer, M. G., L. Jones, and M. S. Zuber. 1968. *The Mutants of Maize*. Madison, WI: Crop Science Society of America. A color catalog of the many, and often bizarre, mutants used by corn geneticists.

Schull, W. J., et al. 1981. "Genetic Effect of the Atomic Bombs: A Reappraisal." *Science* 213: 1220–1227. A summary of all the indicators of potential genetic effects of the Hiroshima and Nagasaki explosions, concluding that, "In no instance is there a statistically significant effect of parental exposure; but for all indicators the observed effect is in the direction suggested by the hypothesis that genetic damage resulted from the exposure."

Capítulo 16

Auerbach, C. 1976. *Mutation Research*. London: Chapman & Hall. Standard text by a pioneer researcher.

Cairns, J. 1978. *Cancer: Science and Society*. New York: W. H. Freeman. A fascinating discussion of the origins of human cancers and of the role played by the environment.

Croce, C. M., and H. Koprowski. 1978. "The Genetics of Human Cancer." *Scientific American* (February). An excellent popular account.

Devoret, R. 1979. "Bacterial Tests for Potential Carcinogens." *Scientific American* (August). This article describes the use of mutation tests to screen for carcinogens and includes some details of DNA reactions.

Drake, J. W. 1970. *The Molecular Basis of Mutation*. San Francisco: Holden-Day. One of the few standard texts on the subject.

Eisenstadt, E. 1987. "Analysis of Mutagenesis." In Escherichia coli *and* Salmonella typhimurium: *Cellular and Molecular Biology*, F. C. Neidhardt, ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. A comprehensive review of studies of mutagenesis in bacteria.

Friedberg, E. C., G. C. Walker, and W. Siede. 1995. *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology. A complete review text covering mutagenesis and repair in both bacteria and higher cells. An excellent source for human genetic diseases and cancer in relation to repair genes.

Miller, J. H. 1996. "Spontaneous Mutators in Bacteria: Insights into Pathways of Mutagenesis and Repair." *Annual Review of Microbiology* 50: 625–643. A review of mutagenesis and repair in bacteria.

Walker, G. C. 1984. "Mutagenesis and Inducible Responses to Deoxyribonucleic Acid Damage in *Escherichia coli*." *Microbiological Reviews* 48: 60–93. A review of mutagenesis and repair, with an excellent discussion of the SOS system.

Capítulos 17 y 18

deGrouchy, J., and C. Turleau. 1984. *Clinical Atlas of Human Chromosomes*. New York: Wiley. A systematic examination of all the human chromosomes and the aberrations associated with them.

Dellarco, V. L., P. E. Voytek, and A. Hollaender. 1985. *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms*. New York: Plenum Press. A collection of research summaries on aneuploidy in humans and experimental organisms.

Epstein, C. J., et al. 1983. "Recent Developments in Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases and Birth Defects." *Annual Review of Genetics* 17: 49–83. Includes amniocentesis.

Feldman, M. G., and E. R. Sears. 1981. "The Wild Gene Resources of Wheat." *Scientific American* (January). A general discussion of the

Kenyon, C. 1995. "A Perfect Vulva Every Time: Gradients and Signaling Cascades in *C. elegans*." *Cell* 82: 171–174.

Maruta, H., and A. W. Burgess. 1994. "Regulation of the Ras Signaling Network." *BioEssays* 16: 489–496.

Murray, A. W. 1995. "The Genetics of Cell Cycle Checkpoints." *Current Opinion in Genetics and Development* 5: 5–11.

Neer, E. J. 1995. "Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals." *Cell* 80: 249–257.

Nigg, E. A. 1995. "Cyclin-Dependent Protein Kinases: Key Regulators of the Eukaryotic Cell Cycle." *BioEssays* 17: 471–480.

Picksley, S. M., and D. P. Lane. 1994. "p53 and Rb: Their Cellular Roles." *Current Opinion in Cell Biology* 6: 853–858.

Rhyu, M. S., and J. A. Knoblich. 1995. "Spindle Orientation and Asymmetric Cell Fate." *Cell* 82: 523–525.

Sohn, R. H., and P. J. Goldschmidt-Clermont. 1994. "Profilin: At the Crossroads of Signal Transduction and the Actin Cytoskeleton." *BioEssays* 16: 465–472.

Sullivan, W., and W. E. Theurkauf. 1995. "The Cytoskeleton and Morphogenesis of the Early *Drosophila* Embryo." *Current Opinion in Cell Biology* 7: 18–22.

Thomas, B. J., and S. L. Zipursky. 1994. "Early Pattern Formation in the Developing *Drosophila* Eye." *Trends in Cell Biology* 4: 389–394.

Weinberg, R. A. 1995. "The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control." *Cell* 81: 323–330.

Zipursky, S. L., and G. M. Rubin. 1994. "Determination of Neuronal Cell Fate: Lessons from the R7 Neuron of *Drosophila*." *Annual Review of Neuroscience* 17: 373–397.

Capítulo 23

Affara, N. A. 1991. "Sex and the Single Y." *BioEssays* 13: 475–478. Mammalian sex determination.

Ballabio, A., and H. F. Willard. 1992. "Mammalian X-Chromosome Inactivation and the XIST Gene." *Current Opinion in Genetics and Development* 2: 439–448.

Barlow, D. P. 1994. "Imprinting: A Gamete's Point of View." *Trends in Genetics* 10: 194–199.

Capecchi, M. R. 1994. "Targeted Gene Replacement." *Scientific American* (March). A description of approaches to the alteration of gene structure exploiting the cellular machinery for DNA repair and homologous recombination by one of the innovators of the technology.

Curtis, D., R. Lehmann, and P. D. Zamore. 1995. "Translational Regulation in Development." *Cell* 81: 171–178.

DiNardo, S., J. Heemskerk, S. Dougan, and P. H. O'Farrell. 1994. "The Making of a Maggot: Patterning the *Drosophila* Embryonic Epidermis." *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 529–534.

Duboule, D., and G. Morata. 1994. "Colinearity and Functional Hierarchy among the Genes of the Homeotic Complexes." *Trends in Genetics* 10: 358–364.

Eden, S., and H. Cedar. 1994. "Role of DNA Methylation in the Regulation of Transcription." *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 255–259.

Efstratiadis, A. 1994. "Parental Imprinting of Autosomal Mammalian Genes." *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 265–280.

Ehlich, A., and R. Küppers. 1995. "Analysis of Immunoglobulin Rearrangements in Single B Cells." *Current Opinion in Immunology* 4: 281–284.

Englehard, V. H. 1994. "How Cells Present Antigen." *Scientific American* (August).

Gonzalez-Crespo, S., and M. Levine. 1994. "Related Target Enhancers for Dorsal and NF-kappa B-Signaling Pathways." *Science* 264: 255–258.

Hlskamp, M., and D. Tautz. 1991. "Gap Genes and Gradients: The Logic Behind the Gaps." *BioEssays* 13: 261–268.

Ip, Y. T., and M. Levine. 1994. "Molecular Genetics of *Drosophila* Immunity." *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 672–677.

Jorgensen, R. A. 1995. "Co-suppression, Flower Color Patterns, and Metastable Gene Expression States." *Science* 268: 686–691.

Kenyon, C. 1994. "If Birds Can Fly, Why Can't We? Homeotic Genes and Evolution." *Cell* 78: 175–180.

Kingston, R. E., and M. R. Green. 1994. "Modeling Eukaryotic Transcriptional Activation." *Current Biology* 4: 325–332.

Klingler, M. 1994. "Segmentation in Insects: How Singular Is *Drosophila*?" *BioEssays* 16: 391–392.

Kornberg, T. B., and T. Tabata. 1993. "Segmentation of the *Drosophila* Embryo." *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 585–594.

Krumlauf, R. 1994. "*Hox* Genes in Vertebrate Development." *Cell* 78: 191–201.

Lawrence, P. A., and G. Morata. 1994. "Homeobox Genes: Their Function in *Drosophila* Segmentation and Pattern Formation." *Cell* 78: 181–189.

Lovell-Badge, R. 1992. "Testis Determination: Soft Talk and Kinky Sex." *Current Opinion in Genetics and Development* 2: 596–601.

Marshall-Graves, J. A. 1995. "The Origin and Function of the Mammalian Y Chromosome and Y-Borne Genes: An Evolving Understanding." *BioEssays* 17: 311–320.

McGinnis, W., and M. Kuziora. 1994. "The Molecular Architecture of Body Design." *Scientific American* (February).

McKeown, M. 1992. "Sex Differentiation: The Role of Alternative Splicing." *Current Opinion in Genetics and Development* 2: 299–304.

Meyerowitz, E. M. 1994. "Genetics of Flower Development." *Scientific American* (November). Similar families of transcription factors are found to be responsible for homeotic mutations during plant pattern formation as well.

Moore, T., and D. Haig. 1991. "Genomic Imprinting in Mammalian Development: A Parental Tug-of-War." *Trends in Genetics* 7: 45–49.

Newman, A. J. 1994. "Pre-mRNA Splicing." *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 298–304.

Orlando, V., and R. Paro. 1995. "Chromatin Multiprotein Complexes Involved in the Maintenance of Transcription Patterns." *Current Opinion in Genetics and Development* 5: 174–179.

Parkhurst, S. M., and P. M. Meneely. 1994. "Sex Determination and Dosage Compensation: Lessons from Flies and Worms." *Science* 264: 924–932.

Perrimon, N., and C. Desplan. 1994. "Signal Transduction in the Early *Drosophila* Embryo: When Genetics Meets Biochemistry." *Trends in Biochemical Sciences* 19: 509–513.

Pfeifer, K., and S. M. Tilghman. 1994. "Allele-Specific Gene Expression in Mammals: The Curious Case of the Imprinted RNAs." *Genes and Development* 8: 1867–1874.

Quiring, R., U. Walldorf, U. Kloter, and W. Gehring. 1994. "Homology of the Eyeless Gene of *Drosophila* to the Small Eye Gene in Mice and Aniridia in Humans. *Science* 265: 785–789.

Schüpbach, T., and S. Roth. 1994. "Dorsoventral Patterning in *Drosophila* Oogenesis." *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 502–507.

St. Johnston, R. D. 1994. "RNA Localization: Getting to the Top." *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 54–56.

St. Johnston, R. D. 1995. "The Intracellular Localization of Messenger RNAs." *Cell* 81: 161–170.

Tautz, D., and R. J. Sommer. 1995. "Evolution of Segmentation Genes in Insects." *Trends in Genetics* 11: 23–27.

Tijan, R. 1995. "Molecular Machines That Control Genes." *Scientific American* (February).

Weissman, I. L., and M. D. Cooper. 1993. "How the Immune System Develops." *Scientific American* (September). This entire issue is on the biology of the immune system and contains several other interesting papers.

Wolpert, L. 1994. "Positional Information and Pattern Formation in Development." *Developmental Genetics* 15: 485–490.

Capítulo 24

Beadle, G. W. 1980. "The Ancestry of Corn." *Scientific American* (January). A popular account of the various clues that led to the modern version

Bodmer, W. F., and L. L. Cavalli-Sforza. 1976. *Genetics, Evolution, and Man.* New York: W. H. Freeman.

Cavalli-Sforza, L. L., P. Menozzi, and A. Piazza. 1994. *The History and Geography of Human Genes.* Princeton, NJ: Princeton University Press. A complete discussion of human genetic variation, its history, and the forces molding it, with complete tables of human gene frequencies.

Clarke, B. 1975. "The Causes of Biological Diversity." *Scientific American* (August). A popular account emphasizing genetic polymorphism.

Crow, J. F. 1979. "Genes That Violate Mendel's Rules." *Scientific American* (February). An interesting article on a topic called segregation distortion (not treated in this text) and its effects in populations.

Dobzhansky, T. 1951. *Genetics and the Origin of Species.* New York: Columbia University Press. The classic synthesis of population genetics and the processes of evolution. The most influential book on evolution since Darwin's *Origin of Species.*

Evolution. 1978. *Scientific American* (September). This issue contains several articles relevant to population genetics.

Ford, E. B. 1971. *Ecological Genetics,* 3d ed. London: Chapman & Hall. A nonmathematical treatment of the role of genetic variation in nature, stressing morphological variation.

Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology,* 3d ed. Sunderland, MA: Sinauer. The best modern discussion of population genetics, ecology, and evolution from both a theoretical and an experimental point of view.

Hartl, D. L., and A. G. Clark. 1989. *Principles of Population Genetics,* 2d ed. Sunderland, MA: Sinauer.

Lerner, I. M., and W. J. Libby. 1976. *Heredity, Evolution, and Society,* 2d ed. New York: W. H. Freeman. A text meant for nonscience students.

Lewontin, R. C. 1974. *The Genetic Basis of Evolutionary Change.* New York: Columbia University Press. A discussion of the prevalence and role of genetic variation in natural populations. Both morphological and protein variations are considered.

Lewontin, R. C. 1982. *Human Diversity.* New York: Scientific American Books. Applies concepts of population genetics to human diversity and evolution.

Li, W. H., and D. Graur. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution.* Sunderland, MA: Sinauer. An excellent review of what is known about the forces and rates of evolution of proteins and DNA sequences.

Wilson, A. C. 1985. "The Molecular Basis of Evolution." *Scientific American* (October).

Capítulo 25

Bodmer, W. F., and L. L. Cavalli-Sforza. 1970. "Intelligence and Race." *Scientific American* (October). A popular treatment, including a discussion of heritability.

Falconer, D. S. 1981. *Introduction to Quantitative Genetics.* 2d ed. New York: Ronald Press. A widely read text with a strong mathematical emphasis.

Feldman, M. W., and R. C. Lewontin. 1975. "The Heritability Hangup." *Science* 190: 1163–1168. A discussion of the meaning of heritability and its limitations, especially in relation to human intelligence.

Lewontin, R. C. 1974. "The Analysis of Variance and the Analysis of Causes." *American Journal of Human Genetics* 26: 400–411. A discussion of the meaning of the analysis of variance in genetics as a method for determining the roles of heredity and environment in determining phenotype.

Lewontin, R. C. 1982. *Human Diversity.* New York: Scientific American Books. Includes a discussion of quantitative variation in human populations.

Capítulo 26

Dobzhansky, T. 1951. *Genetics and the Origin of Species.* New York: Columbia University Press. The classic synthesis of population genetics and the processes of evolution. The most influential book on evolution since Darwin's *Origin of Species.*

Evolution. 1978. *Scientific American* (September). This issue contains several articles relevant to population genetics.

Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology,* 3d ed. Sunderland, MA: Sinauer. The best modern discussion of population genetics, ecology, and evolution from both a theoretical and an experimental point of view.

Li, W. H., and D. Graur. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution.* Sunderland, MA: Sinauer. An excellent review of what is known about the forces and rates of evolution of proteins and DNA sequences.

Wilson, A. C. 1985. "The Molecular Basis of Evolution." *Scientific American* (October).

Glosario

A Adenina o adenosina.

aberración cromosómica Cualquier clase de cambio en la estructura o en el número de los cromosomas.

ácido desoxirribonucleico *Véase* **DNA**.

ácido ribonucleico *Véase* **RNA**.

acondroplasia Un tipo de enanismo humano que se hereda como un carácter autosómico dominante.

adaptación En sentido evolutivo, algún aspecto heredable del fenotipo de un individuo que incrementa su probabilidad de supervivencia y reproducción en el medio ambiente en el que habita.

adenina Base púrica que empareja con la timina en la doble hélice del DNA.

adenosina Nucleósido cuya base nitrogenada es la adenina.

ADP Difosfato de adenosina.

agente alquilante Compuesto capaz de introducir radicales alquilos (por ejemplo, grupos metilos o etilos) en otra molécula. Muchos mutágenos actúan mediante alquilaciones.

agente intercalante Compuesto químico que puede introducirse entre las bases apiladas en el interior de la doble hélice de DNA, y suele provocar una mutación de cambio de fase.

aislamiento poscigótico Fallo en el intercambio de genes entre especies debido a que los cigotos que se forman no se desarrollan en un adulto o a que, en el caso de que sí se desarrollen, los adultos de uno o de ambos sexos son estériles.

aislamiento precigótico Fallo en el intercambio de genes entre especies debido a que los cigotos nunca se forman. La incapacidad de formar los cigotos puede ser una consecuencia de diferencias temporales o ecológicas entre las especies, barreras relacionadas con el comportamiento que imposibilitan el cruzamiento, impedimento mecánico para el acoplamiento entre los dos sexos o incompatibilidad de los gametos.

Ala Alanina (aminoácido).

albino Fenotipo «blanco», no pigmentado, debido a una mutación en un gen que determina una enzima implicada en la síntesis de un pigmento.

alelismo múltiple Existencia de varios alelos conocidos de un gen.

alelo Una de las diferentes formas de un gen que pueden darse en un único locus.

alelo dominante Alelo que se manifiesta en el fenotipo incluso cuando está en heterocigosis frente a un alelo recesivo; así, si *A* es dominante sobre *a*, *AA* y *Aa* manifiestan el mismo fenotipo.

alelo fijado Alelo para el que son homocigóticos todos los miembros de la población en estudio, de manera que no existe ningún otro alelo para ese locus en dicha población.

alelo letal Alelo cuya expresión fenotípica resulta en la muerte del individuo.

alelo mutante Alelo que difiere del alelo presente en el tipo estándar o silvestre.

alelo nulo Alelo cuyo efecto molecular es la ausencia del producto génico normal o cuya consecuencia fenotípica es la desaparición de la función normal.

alelo recesivo Alelo cuyo efecto fenotípico no se manifiesta en el heterocigoto.

alopoliploide *Véase* **anfidiploide**.

alternancia de generaciones La alternancia de las fases gametofíticas y esporofíticas durante el ciclo de vida de una planta.

aminoácido Elemento básico del que están formados las proteínas y péptidos.

amniocentesis Técnica para analizar el genotipo de un embrión o de un feto en el útero con el mínimo riesgo para la madre o el hijo.

AMP Monofosfato de adenosina.

amplificación Producción de muchas copias a partir de una región maestra de DNA.

amplificación génica Proceso por el que se incrementa el número de copias de un segmento cromosómico en una célula somática.

anafase Fase intermedia de la división nuclear durante la cual los cromosomas son dirigidos a los polos de la célula.

análisis de tétradas Uso de las células haploides que derivan de la meiosis (*Véase* **tétrada**) para estudiar el comportamiento de los cromosomas y genes durante la meiosis.

análogo de base Compuesto químico cuya estructura molecular mimetiza la de una base del DNA; debido a ello, el análogo puede actuar como un mutágeno.

anemia falciforme Enfermedad humana potencialmente letal producida por una mutación en un gen que determina una de las subunidades de la hemoglobina, la proteína transportadora de oxígeno. La molécula alterada provoca que los glóbulos rojos adopten forma de hoz. Se hereda como un carácter autosómico recesivo.

anfidiploide Un alopoliploide; poliploide formado mediante la unión de dos dotaciones cromosómicas distintas y su posterior duplicación.

anillo de Balbiani Gran engrosamiento cromosómico.

anticodón Triplete de nucleótidos de una molécula de tRNA que, bajo la influencia del ribosoma, se acopla a un codón determinado del mRNA, de manera que el aminoácido transportado por el tRNA se incorpora a la cadena de la proteína en crecimiento.

anticuerpo Molécula de proteína (inmunoglobulina), producida por el sistema inmunológico, que reconoce un compuesto particular (antígeno) al que se une.

antígeno Molécula reconocida por un anticuerpo (inmunoglobulina). Generalmente, un antígeno concreto puede ser reconocido por múltiples moléculas de anticuerpo.

antígenos de histocompatibilidad Antígenos que determinan la aceptación o rechazo de un implante de tejido.

antiparalelo Término utilizado para describir las orientaciones opuestas de las dos cadenas de una doble hélice de DNA; el extremo 5' de una cadena se alinea con el extremo 3' de la otra.

apilamiento Disposición una sobre otra de las bases nitrogenedas, que tienen una estructura plana, en el centro de la hélice doble de DNA.

aptitud *Véase* **aptitud darwiniana**.

aptitud darwiniana Probabilidad relativa de supervivencia y reproducción de un genotipo.

aptitud dependiente de frecuencia Diferencias en la aptitud, cuya intensidad cambia con los cambios en la frecuencia relativa de los distintos genotipos en la población.

aptitud independiente de frecuencia Aptitud que no depende de interacciones con otros individuos de la misma especie.

Arg Arginina (aminoácido).

armazón (esqueleto) interno del cromosoma Estructura central de un cromosoma a la que se une el solenoide de DNA formando lazos; se compone mayoritariamente de topoisomerasa.

asca En los hongos, un saco que contiene una tétrada o una óctada de ascosporas.

ascospora Espora sexual de ciertas especies de hongos en las que las esporas se encuentran en un saco llamado asca.

Asn Asparagina (aminoácido).

Asp Aspartato (aminoácido).

ATP (trifosfato de adenosina) La «molécula energética» de las células que se sintetiza principalmente en las mitocondrias y los cloroplastos; la energía que se obtiene de la rotura del ATP impulsa muchas reacciones celulares importantes.

atenuador Región adyacente a los genes estructurales del operón *trp*; en presencia de triptófano, esta región actúa reduciendo la tasa de transcripción de los genes estructurales.

autoensamblaje Capacidad de ciertas estructuras biológicas multiméricas para ensamblarse, a partir de sus componentes, mediante movimientos aleatorios de las moléculas y la formación de enlaces químicos débiles entre superficies complementarias.

autofecundación Fertilización de los óvulos con el esperma del mismo individuo.

autofosforilación Proceso por el que una quinasa de proteínas fosforila algún aminoácido específico de la propia enzima.

autónomo celular Hace referencia a un carácter genético de un organismo multicelular en el que únicamente las células genotípicamente mutantes exhiben el fenotipo mutante. Por el contrario, un carácter *no autónomo* es aquel en el que las células genotípicamente mutantes provocan que otras células (con independencia de su genotipo) manifiesten también el fenotipo mutante.

autopoliploide Poliploide formado por la duplicación de un único genoma.

autorradiografía Método analítico en el que se incorpora material radiactivo a las estructuras celulares, que luego se colocan sobre una película o emulsión fotográfica. Se produce así una impresión sobre la película que se corresponde con la localización de los compuestos radiactivos dentro de la célula.

autorradiograma Patrón de manchas oscuras sobre una película o emulsión fotográfica que se obtiene con la técnica de autorradiografía.

autorregulación Proceso por el que la expresión de un gen es controlada por su propio producto génico.

autosoma Cualquier cromosoma que no sea un cromosoma sexual.

auxótrofo Estirpe de microorganismo que sólo prolifera en un medio de cultivo enriquecido con alguna sustancia específica que el tipo silvestre no requiere.

BAC *Véase* **cromosoma artificial de bacterias**.

bacteria lisogénica Célula bacteriana que puede sufrir lisis espontánea debido, por ejemplo, a la liberación de un profago de su cromosoma.

bacteriófago (fago) Virus que infecta a las bacterias.

balanceador Cromosoma con múltiples inversiones, que se utiliza para mantener combinaciones favorables de alelos en un cromosoma homólogo que no presenta inversiones.

bases nitrogenadas Tipos de moléculas, esenciales en la composición de los ácidos nucleicos, que están constituidas por un anillo que contiene nitrógeno; los puentes de hidrógeno entre las bases mantienen unidas las dos cadenas de una hélice doble de DNA.

blastodermo En el embrión de un insecto, estadio en el que existe una sola capa de células o de núcleos periféricos que rodea por completo a la yema interna.

blastodermo celular En insectos, estadio del blastodermo que se inicia una vez que cada uno de los núcleos periféricos ha sido rodeado por una membrana celular individual.

blastodermo sincitial En los insectos, estadio del blastodermo que precede a la formación de las membranas celulares alrededor de los núcleos individuales del embrión temprano.

blástula Estadio temprano del desarrollo de los embriones de los vertebrados inferiores, en el que el embrión consta de una sola capa de células que rodea a la yema interna.

braquidactilia Fenotipo humano de dedos anormalmente cortos que, generalmente, se hereda de forma autosómica dominante.

bucle de retroalimentación *Véase* **autorregulación**.

C Citosina o citidina.

cadena retrasada Cadena que, aparentemente, se fabrica en sentido 3' a 5' durante la replicación del DNA. Se genera mediante la ligación de pequeños fragmentos que se sintetizan individualmente en dirección 5' a 3'.

calva *Véase* **halo de lisis**.

callo Clon de células vegetales indiferenciadas.

cambio tautomérico Isomerización espontánea de una base nitrogenada a una forma alternativa con distinta afinidad en la formación de enlaces por puente de hidrógeno, lo que puede provocar una mutación.

cAMP (monofosfato cíclico de adenosina) Molécula que desempeña una función clave en la regulación de varios procesos celulares.

campo de desarrollo Grupo de células que interaccionan entre sí para formar una estructura en desarrollo (por ejemplo, un embrión, un tejido, un órgano, una extremidad, etc.).

cáncer Enfermedad caracterizada por la proliferación rápida e incontrolada de las células en un tejido de un eucariota multicelular. Los cánceres se consideran normalmente como enfermedades genéticas de células somáticas que surgen mediante mutaciones sucesivas que generan oncogenes o inactivan genes supresores de tumores.

CAP (proteína activadora de los genes catabólicos) Proteína cuya presencia se requiere para la activación del operón *lac*.

caperuza Molécula de 7-metil-guanosina que se añade al extremo 5' de un pre-mRNA.

carácter Algún atributo de los individuos de una especie para el que se pueden definir varias formas heredables distintas.

carácter familiar Carácter compartido por varios miembros de una familia.

caracteres sexuales secundarios Fenotipos asociados al sexo en los tejidos somáticos de los animales sexualmente dimórficos.

carcinógeno Sustancia que provoca cáncer.

cariotipo Complemento cromosómico completo de un individuo o célula tal como se observa durante la metafase mitótica.

cartografía física Localización de las posiciones de fragmentos genómicos clonados.

cartografía por RFLP Técnica en la que los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción se emplean como loci de referencia para la cartografía de genes conocidos o de otros loci de RFLP.

cascada de transducción de una señal Serie de sucesos secuenciales, como fosforilaciones de proteínas, que pasan una señal recibida por un receptor transmembrana a través de una serie de moléculas intermediarias hasta las moléculas reguladoras terminales, tales como factores de transcripción, que resultan modificadas en respuesta a la señal.

catión Ion cargado positivamente (tal como el K^+).

caza *Véase* **experimento de pulso y caza**.

caza de mutantes Proceso de acumulación de distintos mutantes con anomalías en cierta estructura o en cierta función, como paso previo para la disección por mutación de un proceso biológico.

CDK *Véase* **quinasa de proteínas dependiente de ciclina**.

cDNA *Véase* **DNA complementario**.

cebador RNA o DNA pequeño de una sola cadena que, unido a una cadena molde, aporta el extremo 3′ a partir del cual se prolongará la nueva cadena.

célula aneuploide Célula cuyo número cromosómico difiere del número de cromosomas normal de la especie en uno o pocos cromosomas.

célula anucleada Célula que carece de núcleo.

célula blástica Célula que se divide, en general de forma asimétrica, para dar lugar a dos células distintas. Una es una célula blástica como la parental y la otra entra en un proceso de diferenciación. De esta forma, se mantiene una población de células en continua reproducción que libera células destinadas a diferenciarse.

célula de alta frecuencia de recombinación (Hfr) (del inglés, *High-Frecuency Recombination*). En *E. coli*, célula con el factor de fertilidad integrado en el cromosoma bacteriano; célula donante (masculina).

célula eucariótica Célula con núcleo.

células embrionarias pluripotentes Líneas de células cultivadas que proceden de embriones muy tempranos y que son prácticamente totipotentes. Esto es, dichas células pueden implantarse en un embrión hospedador y llegar a poblar muchos de los tejidos del animal en desarrollo, incluyendo la línea germinal, lo cual resulta de especial interés. Las manipulaciones de estas células ES son muy utilizadas en el ratón para la inactivación dirigida de genes.

células ES (del inglés, *Embryonic Stem cells*) *Véase* **células embrionarias pluripotentes**.

célula F^- En *E. coli*, célula que carece de factor de fertilidad; célula femenina.

célula F^+ En *E. coli*, célula que contiene un factor de fertilidad en su forma libre; célula masculina.

célula procariota Célula sin membrana nuclear y que no tiene, por tanto, el núcleo separado.

célula troncal *Véase* **célula blástica**.

células hijas Las dos células idénticas formadas por la división asexual de un célula.

células nodriza En los insectos, células hermanas del oocito. Estas células producen la mayor parte del contenido citoplásmico del oocito maduro.

célula somática Célula que no está destinada a convertirse en gameto; «célula del cuerpo» cuyos genes no se transmitirán a las generaciones futuras.

centimorgan *Véase* **unidad de mapa**.

v001b;004**centro activo** Parte de una proteína que debe mantener una conformación determinada para que dicha proteína sea activa. Por ejemplo, la región de una enzima a la que se une el sustrato.

centro organizador de los microtúbulos Zona del citoesqueleto de microtúbulos en la que se agrupan todos los extremos menos de los microtúbulos. Generalmente se localiza cerca del centro de la célula.

centrómero Región especializada de DNA presente en todos los cromosomas eucarióticos que actúa como lugar de unión para las proteínas del cinetocoro.

cepa *Véase* **estirpe**.

césped Capa continua de bacterias sobre la superficie de un medio de cultivo sólido.

ciclina Familia de proteínas lábiles que se sintetizan y degradan en momentos determinados de cada ciclo celular y regulan la progresión de dicho ciclo mediante sus interacciones con quinasas de proteínas dependientes de ciclinas específicas.

ciclo celular Serie de acontecimientos que tienen lugar durante las divisiones de las células mitóticas. El ciclo celular oscila entre mitosis (fase M) e interfase. Esta última puede subdividirse, por orden, en G_1, fase S y G_2. La síntesis de DNA tiene lugar durante la fase S. La duración del ciclo celular está regulada por una opción especial en G_1 en la que las células pueden entrar en una fase de reposo llamada G_0.

cigoto Célula formada por la fusión de un óvulo y un espermatozoide; célula diploide única que se divide mitóticamente para producir un organismo diploide diferenciado.

cigoto biparental Cigoto de *Chlamydomonas* que contiene cpDNA de ambos parentales; tales células suelen ser raras.

cinetocoro Complejo de proteínas en el centrómero al que se une una fibra del huso acromático.

cistrón Definido originalmente como una unidad genética funcional dentro de la cual dos mutaciones no pueden complementar. En la actualidad, equivale al término gen, entendido como un segmento de DNA que determina un polipéptido (o una molécula de RNA funcional, tal como un tRNA o un rRNA).

citidina Nucleósido cuya base nitrogenada es la citosina.

citocromos Clase de proteínas, localizadas en las membranas de las mitocondrias, cuya función principal es la fosforilación oxidativa del ADP para formar ATP.

citogenética Enfoque citológico a la Genética, que consiste fundamentalmente en el estudio de los cromosomas al microscopio.

citoheterocarionte Célula que contiene dos tipos genéticamente diferentes de un orgánulo concreto.

citopatías mitocondriales Enfermedades humanas producidas por mutaciones puntuales o deleciones en el DNA mitocondrial; son de herencia materna.

citoplasma Material comprendido entre las membranas celular y nuclear; incluye material fluido (el citosol), orgánulos y varias membranas.

citosina Base pirimidínica que empareja con la guanina.

citosol Líquido del citoplasma, por fuera de los orgánulos.

clon (1) Grupo de células genéticamente idénticas o de individuos que derivan de un mismo ancestro por reproducción asexual. (2) (*coloquialmente*) Individuo formado por algún proceso asexual, de manera que es genéticamente idéntico a su parental. (3) *Véase* **clon de DNA**.

clon de DNA Fragmento de DNA que se ha insertado en una molécula vector, tal como un plásmido o el cromosoma de un fago, lo que facilita su replicación para la formación de muchas copias.

clones contiguos Abreviado en inglés como *contig*, palabra también utilizada por los hispanohablantes. Serie ordenada de clones solapados que representan en su totalidad una región cromosómica o un genoma.

cloroplasto Orgánulo de las plantas que contiene clorofila, en el que se produce la fotosíntesis.

cM (centimorgan) *Véase* **unidad de mapa**.

cociente X:A Cociente entre el número de cromosomas X y el número de dotaciones de autosomas.

código Lista de los 64 posibles codones y sus significados en la traducción (los aminoácidos correspondientes).

código degenerado Código genético en el que algunos aminoácidos están determinados por más de un codón distinto.

código genético Conjunto de correspondencias entre tripletes de pares de nucleótidos en el DNA y aminoácidos en las proteínas.

codominancia Situación en la que un heterocigoto muestra por igual los efectos fenotípicos de ambos alelos.

codón Fragmento de DNA (de tres pares de nucleótidos de longitud) que cifra un único aminoácido.

codón ámbar El codón UAG, uno de los codones sin sentido.

codón ocre El codón UAA, uno de los codones sin sentido.

codón ópalo El codón UGA, uno de los codones sin sentido.

codón sin sentido Codón para el que no existe una molécula de tRNA normal; la presencia de un codón sin sentido produce la terminación de la traducción (finalización de la cadena polipeptídica). Los tres codones sin sentido reciben la denominación de ámbar, ocre y ópalo.

coeficiente de coincidencia Cociente entre el número de dobles recombinantes observado y el esperado.

coeficiente de consanguinidad Probabilidad de homocigosis que resulta de que el cigoto reciba dos copias de un *mismo* alelo presente en un ancestro.

coeficiente de correlación Medida estadística del grado de relación entre los distintos valores de dos variables.

coeficiente de regresión Pendiente de la recta que mejor se ajusta a la relación entre dos variables que están correlacionadas.

coeficiente de selección (*s*) Exceso o deficiencia proporcional de la aptitud de un genotipo en relación con otro genotipo.

cointegrado Producto de la fusión de dos elementos circulares para formar un único círculo de mayor tamaño.

cola Extremo 3' no traducido de un mRNA.

cola de poli-A Ristra de nucleótidos de adenina que se añade al mRNA después de su transcripción.

colinealidad Correspondencia entre la localización de un sitio mutado en un gen y la del cambio de aminoácido en el polipéptido determinado por dicho gen.

colonia Clon visible de células.

compartimentalización Existencia de fronteras en un organismo, más allá de las cuales nunca se extenderá un clon específico de células durante el desarrollo.

compensación de dosis En los organismos que emplean un mecanismo cromosómico de determinación del sexo (como XX frente a XY), proceso que permite que los genes estructurales normales que están situados en el cromosoma sexual se expresen con la misma intensidad en hembras que en machos, independientemente del número de cromosomas sexuales. En mamíferos, la compensación de dosis actúa manteniendo activo un solo cromosoma X de cada célula; en *Drosophila*, se produce por hiperactivación del cromosoma X del macho.

competente Célula capaz de incorporar DNA exógeno y, por tanto, de ser transformada.

complejo sinaptonémico Estructura compleja que mantiene unidos los cromosomas homólogos durante la profase de la meiosis.

complementación Aparición de un fenotipo silvestre cuando dos mutaciones diferentes se combinan en un diploide o un heterocarionte.

complementación funcional Uso de un fragmento clonado de DNA silvestre para transformar un organismo mutante en uno normal; empleado para identificar el clon que lleva un gen determinado.

condiciones permisivas Condiciones ambientales en las que un mutante condicional muestra el fenotipo silvestre.

condiciones restrictivas Condiciones ambientales en las que un mutante condicional muestra el fenotipo mutante.

configuración *cis* Al genotipo $a_1\ a_2/+\ +$ en un heterocigoto portador de dos mutaciones en un gen o grupo de genes.

configuración *trans* Al genotipo $a_1\ +/+\ a_2$ en un heterocigoto portador de dos mutaciones en un gen o grupo de genes.

conjugación Unión de dos células bacterianas, durante la cual se transfiere material cromosómico desde la célula donante a la receptora.

consanguinidad Cruzamiento entre individuos con algún grado de parentesco.

constitutivo Gen que siempre se expresa de forma no regulada (referido al control génico).

control negativo Regulación mediada por factores que bloquean o eliminan la transcripción.

control positivo Regulación mediada por una proteína que se requiere para la activación de una unidad de transcripción.

conversión de cromátidas Tipo de conversión génica que se infiere de la existencia de parejas de esporas hermanas idénticas en una óctada que muestra una proporción no mendeliana de alelos.

conversión de media cromátida Tipo de conversión génica que se infiere de la presencia de esporas hermanas no idénticas en una óctada de hongos que muestra una proporción alélica no mendeliana.

conversión génica Proceso meiótico de cambio en el que un alelo dirige la conversión en su propia forma del otro alelo compañero.

conversión génica polar Gradiente en las frecuencias de conversión génica a lo largo de un gen.

corpúsculo de Barr Masa que se tiñe con gran intensidad y que corresponde al cromosoma X inactivado.

corpúsculo nu *Véase* **nucleosoma**.

corrección Introducción (probablemente por escisión y reparación) de un par de nucleótidos correctamente emparejados en el lugar en el que un DNA híbrido contiene un par de nucleótidos mal emparejados.

corte en escalón Rotura de las dos cadenas enfrentadas de una molécula de DNA en puntos cercano uno al otro.

cosegregación En *Chlamydomonas*; comportamiento paralelo en un cruce de marcadores cloroplásticos diferentes, debido a que presentan un estrecho ligamiento en el cpDNA.

cósmido Vector de clonación que puede replicarse de forma autónoma, al igual que un plásmido, y empaquetarse en un fago.

cotransducción Transducción simultánea de dos marcadores genéticos bacterianos.

cotransformación Transformación simultánea de dos genes marcadores bacterianos.

covarianza Valor estadístico utilizado para medir el coeficiente de correlación entre dos variables: la covarianza es la media de $(x - \bar{x})(y - \bar{y})$ para todas las parejas de valores de las variables x e y, donde $\bar{x}$ es la media para los valores de x e $\bar{y}$ es la media para los valores de y.

cpDNA DNA de los cloroplastos.

cristalografía de rayos X Técnica que permite deducir la estructura de una molécula, en la que se dirige un haz de rayos X sobre un cristal del compuesto en estudio y se analiza la difracción de los rayos.

cRNA *Véase* **RNA complementario**.

cromátida Una de las dos réplicas, unidas entre sí, producidas por la división del cromosoma.

cromátidas hermanas Las dos cromátidas idénticas que se forman por la replicación de un cromosoma.

cromatina Sustancia de que están compuestos los cromosomas; hoy sabemos que incluye DNA, proteínas cromosómicas y RNA cromosómico.

cromocentro Punto por el que los cromosomas politénicos parecen estar unidos.

cromómero Pequeña estructura de forma esférica, visible en los cromosomas durante las profases meiótica y mitótica.

cromosoma Agrupación lineal de genes y otros DNA, dispuestos de un extremo a otro, que incluye a veces las proteínas y RNA asociados.

cromosoma acéntrico Cromosoma que carece de centrómero.

cromosoma acrocéntrico Cromosoma cuyo centrómero está localizado ligeramente más cerca de un extremo que del otro.

cromosoma artificial de bacterias Plásmido F manipulado con técnicas de ingeniería genética para que sirva como vector de clonación de grandes fragmentos de DNA.

cromosoma dicéntrico Cromosoma con dos centrómeros.

cromosoma en escobilla Cromosoma de gran tamaño que se encuentra en los óvulos de los anfibios, con lazos laterales de DNA que le dan su apariencia característica en escobilla cuando se observa al microscopio.

cromosoma Filadelfia Translocación entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, se encuentra a menudo en los glóbulos blancos de los pacientes afectados de leucemia mieloide crónica.

cromosoma metacéntrico Cromosoma que tiene su centrómero localizado en su punto medio.

cromosoma politénico Cromosoma gigante producido por un proceso de endomitosis en el que las múltiples dotaciones cromosómicas permanecen unidas en un número haploide de cromosomas.

cromosoma satélite Cromosoma que, aparentemente, es una adición al genoma normal.

cromosoma sexual Cromosoma cuya presencia o ausencia está correlacionada con el sexo del portador; cromosoma que desempeña una función en la determinación del sexo.

cromosoma telocéntrico Cromosoma que tiene el centrómero en un extremo.

cromosomas en arlequín Cromátidas hermanas que se tiñen de forma distinta, de manera que una aparece en tono oscuro y la otra en tono claro.

cromosomas heteromórficos Pareja de cromosomas con alguna homología pero que difieren en tamaño, forma o propiedades de tinción.

cromosomas homeólogos Cromosomas parcialmente homólogos, lo que normalmente indica alguna homología ancestral de origen.

cromosomas homólogos Cromosomas que emparejan entre sí durante la meiosis o cromosomas de distintas especies que han mantenido la mayoría de los mismos genes durante su evolución a partir de un ancestro común.

cruzamiento (cruce) Apareamiento deliberado de dos tipos parentales que se realiza en el análisis genético.

cruzamiento aleatorio Cruzamiento entre individuos realizado de forma que la elección de la pareja no se ve influida por los genotipos, referidos éstos a los genes en estudio.

cruzamiento con discriminación negativa Cruzamiento preferente entre individuos fenotípicamente distintos.

cruzamiento con discriminación positiva Situación en la que los individuos fenotípicamente iguales se cruzan con mayor frecuencia de lo esperado al azar.

cruzamiento de prueba Cruzamiento entre un individuo de genotipo desconocido o un heterocigoto (o un heterocigoto múltiple) con un individuo de prueba.

cruzamiento de prueba de tres puntos Cruzamiento de prueba en el que uno de los parentales es heterocigótico para tres genes.

cruzamiento dihíbrido Cruzamiento entre dos individuos heterocigóticos idénticos para dos loci —por ejemplo, $A/a \cdot B/b \times A/a \cdot B/b$—.

cruzamiento forzado no consanguíneo Aquel en el que se evita deliberadamente el cruce entre individuos con algún parentesco.

cruzamiento interrumpido Técnica utilizada en la cartografía de genes bacterianos, que consiste en la determinación de la secuencia temporal en la que los genes de una estirpe donante se introducen en las células receptoras.

cruzamiento monohíbrido Cruzamiento entre dos individuos igualmente heterocigóticos para un gen —por ejemplo, $A/a \times A/a$.

cruzamiento puente Cruzamiento realizado para intercambiar alelos entre dos especies sexualmente aisladas, en el que se transfieren primero los alelos a una especie intermediaria que es compatible sexualmente con ambas.

cruzamientos recíprocos Par de cruzamientos del tipo genotipo A ♀ × × genotipo B ♂ y genotipo B ♀ × A ♂.

cuerpo fructífero En los hongos, órgano en el que ocurre la meiosis y se producen las esporas sexuales.

cultivo Tejido o células que se hacen proliferar para experimentación, multiplicándose por división asexual.

CVS (del inglés, *Chorionic Villus Sampling*) Toma de una muestra de la placenta con el fin de obtener tejido fetal para el análisis cromosómico y de DNA en el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas.

Cys Cisteína (aminoácido).

deleción Eliminación de un segmento de un cromosoma.

densidad de flotación Medida de la tendencia de una sustancia a flotar en otra sustancia; las moléculas grandes se distinguen por sus diferentes densidades de flotación en un fluido estándar. Se mide mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad.

deriva *Véase* **deriva genética aleatoria**.

deriva genética aleatoria Cambios en las frecuencias alélicas debidos a que los alelos que aparecen en la descendencia no constituyen una muestra representativa de los alelos presentes en los parentales.

desarrollo Proceso mediante el cual una única célula da lugar a un organismo diferenciado.

desnaturalización Separación de las dos cadenas de una hélice doble de DNA, o la alteración severa de la estructura de cualquier molécula compleja sin que haya rotura de los enlaces principales de sus cadenas.

desoxirribonucleasa *Véase* **DNasa**.

destino celular Estado terminal diferenciado al que ha quedado comprometida una célula en desarrollo.

desviación estándar Raíz cuadrada de la varianza.

determinación Proceso por el que las células son comprometidas hacia la adquisición de un destino de desarrollo determinado.

determinación de sexo Proceso genético o ambiental por el que se establece el sexo de un individuo.

determinación fenotípica del sexo Determinación del sexo por causas no genéticas.

determinante Molécula con una determinada localización espacial, que hace que las células adopten un destino de desarrollo específico o un conjunto de destinos relacionados.

díada Pareja de cromátidas hermanas unidas por el centrómero, como ocurre en la primera división meiótica.

diagrama de Punnett Cuadro empleado para representar gráficamente los cigotos originados por las fusiones de los diferentes gametos en un cruzamiento determinado.

diferencia en el carácter Formas alternativas de un atributo o carácter dentro de una especie.

diferencial de selección Diferencia entre la media de una población y la media de los individuos seleccionados para ser los progenitores de la siguiente generación.

diferenciación Cambios en la forma y la fisiología de las células que están asociadas con la formación de los tipos celulares terminales de un órgano o tejido concreto.

dímero de timina Par de timinas adyacentes en el DNA que están unidas mediante enlace químico; los mecanismos celulares que reparan esta lesión cometen a menudo errores que dan lugar a mutaciones.

dimorfismo «Polimorfimo» que consta únicamente de dos formas distintas.

diploide Célula que tiene dos dotaciones cromosómicas o individuo que tiene dos dotaciones cromosómicas en cada una de sus células.

diploide parcial *Véase* **merocigoto**.

diploide transitorio Estadio del ciclo de vida, fundamentalmente de los hongos (y algas) haploides, durante el que ocurre la meiosis.

disección genética Utilización de la mutación y la recombinación para la identificación y comprensión de los distintos componentes de una función biológica determinada.

disgénesis híbrida Síndrome de efectos que incluyen esterilidad, aparición de mutaciones, roturas cromosómicas y recombinación en machos. Se presenta en los híbridos de cruzamientos entre ciertas estirpes de laboratorio de *Drosophila* y otras aisladas de la naturaleza.

distribución *Véase* **distribución estadística**.

distribución bimodal Distribución estadística con dos modas.

distribución de Poisson Expresión matemática que permite obtener la probabilidad de que un hecho se repita un cierto número de veces, cuando la probabilidad de que ocurra dicho hecho una vez en la muestra es muy pequeña.

distribución estadística Ordenamiento de las frecuencias de distintas clases cuantitativas o cualitativas de una población.

distrofia muscular de Duchenne Enfermedad muscular en la especie humana que resulta letal. Se debe a una mutación en un gen de gran tamaño que determina la proteína muscular distrofina; se hereda como un carácter recesivo y ligado al X.

ditipo no parental (DNP) Tétrada constituida por dos genotipos distintos, ambos recombinantes.

ditipo parental (DP) Tétrada constituida por dos genotipos distintos, ambos parentales.

diversificación Diferenciación entre líneas distintas de descendientes a lo largo de la evolución.

división celular Proceso por el que se forman dos células a partir de una.

división ecuacional División nuclear que mantiene el mismo grado de ploidía de la célula.

división reduccional División nuclear que produce núcleos hijos que poseen la mitad de los centrómeros del núcleo parental.

DNA (ácido desoxirribonucleico) Doble cadena de nucleótidos engarzados, que tienen como azúcar la desoxirribosa; se trata de la materia fundamental de la que están compuestos los genes.

DNA complementario (cDNA) DNA sintético que ha sido transcrito a partir de un RNA específico mediante la acción de la enzima retrotranscriptasa.

DNA donante Cualquier DNA utilizado en una clonación.

DNA espaciador DNA situado entre genes; se desconoce su función.

DNA foráneo DNA de otro organismo.

DNA microsatélite Tipo de DNA repetido formado por repeticiones sucesivas de un tramo muy pequeño; por ejemplo, un dinucleótido.

DNA minisatélite Tipo de DNA repetido formado por la repetición de tramos pequeños con una secuencia central común; se utilizan para obtener la huella digital de un DNA.

DNA quimérico *Véase* **DNA recombinante**.

DNA recombinante Nueva secuencia de DNA formada por la combinación de dos moléculas no homólogas de DNA.

DNA redundante *Véase* **DNA repetido**.

DNA repetido DNA redundante; secuencias de DNA que están presentes en muchas copias por cada dotación cromosómica.

DNA satélite Cualquier tipo de DNA muy repetido en el genoma; se definió inicialmente como el DNA que formaba una banda satélite tras centrifugación en un gradiente de densidad de cloruro de cesio.

DNasa (desoxirribonucleasa) Enzima que degrada el DNA en nucleótidos.

DNP *Véase* **ditipo no parental**.

doble hélice Estructura del DNA, propuesta por primera vez por Watson y Crick, con dos hélices entrelazadas que se mantienen unidas por puentes de hidrógeno entre pares de bases.

dogma central Hipótesis de que la información fluye únicamente de DNA a RNA y de éste a proteína; aunque en la actualidad se conocen algunas excepciones, la regla es generalmente válida.

dominancia en *cis* Propiedad de un elemento genético para afectar a genes del mismo cromosoma próximos a él.

dominancia incompleta Situación en la que el heterocigoto muestra un fenotipo cuantitativamente (si bien no exactamente) intermedio entre los fenotipos homocigóticos correspondientes (la situación exactamente intermedia se conoce como ausencia de dominancia).

dosis *Véase* **dosis génica**.

dosis génica Número de copias de un gen concreto presentes en el genoma.

dotación cromosómica Grupo de cromosomas diferentes (no homólogos) que lleva el conjunto básico de la información genética de una determinada especie.

DP *Véase* **ditipo parental**.

duplicación Presencia de más de una copia de un determinado segmento cromosómico en una dotación cromosómica.

duplicación en tándem Segmentos cromosómicos idénticos adyacentes.

ecdisona Hormona de la muda en los insectos.

efecto de posición Se emplea para describir la situación en la que la expresión fenotípica de un gen se altera al cambiar la posición del gen en el genoma.

efecto fundador Diferencia en las frecuencias de los alelos entre una población donante y una pequeña población que deriva de ella, debida al muestreo en la primera generación de colonización.

efecto materno Influencia de los tejidos de la madre sobre el fenotipo de sus descendientes.

efecto materno letal Mutación viable en los cigotos, pero las madres homocigóticas para la mutación producen descendientes inviables.

eficacia *Véase* **aptitud**.

electroforesis Técnica para separar en un gel, mediante un campo eléctrico, los distintos componentes de una mezcla de moléculas (proteínas, DNA o RNA).

electroforesis en campo pulsante Técnica electroforética en la que el gel se somete a campos eléctricos alternantes, con ángulos distintos, lo que permite el desplazamiento por el interior del gel de fragmentos grandes de DNA y la separación eficaz de mezclas de tales fragmentos grandes.

elemento controlador Elemento genético móvil capaz de producir una mutación inestable en un gen diana; existen dos tipos, los elementos reguladores y los receptores.

elemento controlador autónomo Elemento controlador que parece combinar la función reguladora y la receptora en una sola unidad, y que al introducirse en un gen origina una mutación inestable.

elemento de respuesta a hormonas (HRE) (del inglés, *Hormone Response Element*). En relación con las hormonas que se unen a un receptor que actúa directamente como factor de transcripción, un HRE es una secuencia de DNA, de acción reguladora en *cis*, a la que se une el complejo receptor-hormona.

elemento genético móvil *Véase* **elemento genético transponible**.

elemento genético transponible Término general para cualquier unidad genética con capacidad de insertarse en un cromosoma, salir del sitio de inserción y situarse en otro lugar; incluye a las secuencias de inserción, los transposones, algunos fagos y los elelementos controladores.

elemento *P* Elemento transponible de *Drosophila* que se utiliza como herramienta en la mutagénesis por inserción y en la transformación genética de la línea germinal.

elemento receptor Elemento controlador que puede insertarse en un gen (generando un mutante) y también salir de él (haciendo así la mutación inestable); estas dos funciones son no autónomas, estando bajo la influencia de un elemento regulador.

elemento regulador *Véase* **elemento receptor**.

eliminación de intrones Reacción que elimina los intrones y une los exones en el RNA.

empalmar *Véase* **eliminación de intrones**.

endogenote *Véase* **merocigoto**.

endonucleasa Enzima que rompe enlaces fosfodiésteres en el interior de una cadena nucleotídica.

endopoliploidía Incremento del número de dotaciones cromosómicas ocasionado por la existencia de replicación sin que haya división celular.

endospermo Tejido triploide de una semilla, formado por la fusión de dos núcleos haploides femeninos y uno masculino.

enfermedad de Huntington Enfermedad letal en la especie humana que se manifiesta a edad tardía y se caracteriza por dar lugar a degeneración nerviosa. Se hereda como un carácter autosómico dominante. Las nuevas mutaciones son raras.

enlace peptídico Enlace que une dos aminoácidos.

enlace fosfodiéster Enlace entre un azúcar y un fosfato; estos enlaces forman el esqueleto azúcar-fosfato del DNA.

entrecruzamiento Intercambio de partes correspondientes de dos cromosomas homólogos mediante rotura y nueva unión.

entrecruzamiento desigual Entrecruzamiento entre cromosomas homólogos que no están perfectamente alineados.

entrecruzamiento doble Dos entrecruzamientos ocurridos en la región cromosómica en estudio.

entrecruzamiento mitótico Entrecruzamiento que se produce tras el apareamiento de dos cromosomas homólogos en un diploide mitótico.

enzima Proteína que funciona como catalizador.

enzima de restricción Endonucleasa que reconoce una secuencia nucleotídica concreta del DNA, denominada diana, cortando en ese punto las dos cadenas del DNA; se conoce una amplia gama de estas enzimas, que son muy utilizadas en ingeniería genética.

episoma Elemento genético de las bacterias que puede replicarse libremente en el citoplasma o insertarse en el cromosoma bacteriano principal y replicarse con él.

epistasia Situación en la que la expresión fenotípica diferencial de los genotipos de un locus depende del genotipo de otro locus distinto.

epítopo Región de la molécula de un antígeno que es reconocida por una inmunoglobulina concreta.

equilibrio de Hardy-Weinberg Distribución estabilizada de las frecuencias de los genotipos *A/A*, *A/a* y *a/a* en los valores respectivos p^2, $2pq$ y q^2 (donde p y q son las frecuencias de los alelos *A* y *a*), como consecuencia de que los cruzamientos sean al azar y de que no haya efectos de mutación, migración, selección natural o deriva genética aleatoria.

especiación Proceso de formación de nuevas especies mediante la divergencia, a partir de una especie ancestral, de dos o más nuevas especies incapaces de intercambiar genes entre ellas.

especiación alopátrica proceso de divergencia de una especie en dos o más nuevas especies que tiene lugar entre poblaciones que se encuentran geográficamente aisladas unas de otras.

especie Grupo de organismos capaces, de forma biológica, de intercambiar genes ellos, pero incapaces de hacerlo con los miembros de otros grupos.

espora (1) En plantas y hongos, las esporas sexuales son las células sexuales que se producen en la meiosis. (2) En los hongos, las esporas asexuales son células somáticas que se liberan ya sea para actuar como gametos o como células iniciadoras de nuevos individuos haploides.

espora asexual *Véase* **espora**.

espora sexual *Véase* **espora**.

esporofito Estado diploide del ciclo de vida de las plantas, productor de esporas sexuales —esto es, estado en el que ocurre la meiosis—.

EST (marcador molecular expresado) (del inglés, *Expressed Sequence Tag*). Secuencia conocida que deriva de un clon de cDNA; se utiliza para cartografiar e identificar genes durante el análisis genómico.

estadístico Parámetro cuantitativo que es característico de una población, como la media.

estado basal Estado de desarrollo de una célula (o grupo de células) en ausencia de activación por un mecanismo regulador del desarrollo.

estirpe Línea pura, normalmente de organismos haploides, bacterias o virus.

estructura cuaternaria de una proteína Constitución multimérica de la proteína.

estructura cruciforme Región del DNA con secuencias palindrómicas en las dos cadenas; de forma que cada cadena se reasocia consigo misma para formar hélices que se extienden a ambos lados de la hélice principal.

estructura multimérica Estructura compuesta de varias subunidades distintas o idénticas que se mantienen unidas por enlaces débiles.

estructura primaria de una proteína Secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica.

estructura secundaria de una proteína Disposición en espiral o zigzag de la cadena polipeptídica.

estructura terciaria de una proteína Plegamiento o enrollamiento de la estructura secundaria para formar una molécula globular.

estructura solenoide Disposición superenrollada del DNA en los cromosomas de los núcleos eucarióticos, producida por el enrollamiento de la ristra de nucleosomas.

estructura superenrollada Molécula de DNA circular de cadena doble que se enrosca sobre sí misma.

etidio Molécula que puede intercalarse en la doble hélice de DNA cuando está sometida a fuerzas de torsión.

eucariota Organismo compuesto de células eucarióticas.

eucromatina Región cromosómica que se tiñe de manera normal; se cree que contiene los genes de expresión normal.

eugenesia Control estatal de los cruzamientos humanos basado en la definición de genotipos deseables y no deseables, con la intención de mejorar las generaciones futuras.

euploide Célula que contiene la dotación cromosómica haploide repetida cualquier número de veces, o individuo compuesto de tales células.

evolución filética Cambio heredable a lo largo del tiempo en una línea continua de descendencia.

evolución neutra Cambios evolutivos no adaptativos que suceden por deriva genética al azar.

exconjugante Célula bacteriana femenina que acaba de conjugar con una célula masculina y contiene un fragmento de DNA de esta última.

exogenote *Véase* **merocigoto**.

exón Cualquier tramo no intrónico de la secuencia cifradora de un gen; conjuntamente, los exones forman el mRNA y se traducen a una proteína.

exonucleasa Enzima que corta uno a uno los nucleótidos a partir del extremo de una cadena polinucleotídica.

expansión de tripletes Expansión de una repetición de 3 pb que está en un número de copias relativamente bajo a un número elevado de copias, que es la causa de varias enfermedades genéticas, como el síndrome del X frágil.

experimento de pulso y caza Experimento en el que se cultivan las células en un medio radiactivo durante un breve período de tiempo (pulso) y se transfieren luego a un medio no radiactivo durante un período más largo (caza).

expresividad Grado en que un genotipo concreto se expresa fenotípicamente.

expresión ectópica Expresión de un gen en un tejido en el que normalmente no lo hace. Dicha expresión puede deberse a la unión al gen de nuevos elementos intensificadores.

extremos cohesivos Extremos de moléculas de DNA con un patrón «en escalón» que pueden unirse mediante puentes de hidrógeno con las secuencias complementarias de otros extremos formados de igual manera.

FACS (separación de cromosomas activada por fluorescencia) (del inglés, *Fluorescence-Activated Chromosome Sorting*). Utilización de señales fluorescentes específicas en cromosomas teñidos para, haciéndolos pasar en gotas a través de un clasificador que se activa por la señal, separar dichos cromosomas en tubos individuales de contenido uniforme.

factores de crecimiento Moléculas que actúan como señales paracrinas, generalmente polipéptidos secretados, que inducen la división de células que reciben la señal.

factor de fertilidad (factor F) Episoma bacteriano cuya presencia confiere la propiedad de actuar como donante (masculinidad).

factor de transcripción Proteína que se une a elementos reguladores en *cis* (por ejemplo, un intensificador) y, por lo tanto, afecta al inicio de la transcripción de forma directa o indirecta.

factor F′ Factor de fertilidad al que se ha incorporado un fragmento del cromosoma bacteriano.

fago *Véase* **bacteriófago**.

fago atemperado Fago cuyo DNA se puede integrar en el cromosoma bacteriano, convirtiéndose en un profago.

fago lambda (λ) Un tipo («especie») de bacteriófago atemperado.

fago mu Un tipo («especie») de fago con propiedades similares a las de las secuencias de inserción, siendo capaz de insertarse, transponerse, inactivar genes y producir reorganizaciones cromosómicas.

fago virulento Fago que no se puede convertir en profago; la infección con un fago virulento lleva siempre a la lisis de la célula.

familia génica Conjunto de genes de un genoma que descienden del mismo gen ancestral.

fase de acoplamiento Pares de genes ligados en un heterocigoto con la disposición *A B*/*a b*.

fase de repulsión Pares de genes ligados en un heterocigoto con la disposición *A b*/*a B*.

fase G_0 Fase de reposo a la que pueden acceder las células desde la fase G_1 del ciclo celular.

fase G_1 Período de la interfase del ciclo celular que precede a la fase S.

fase G_2 Período de la interfase del ciclo celular que sigue a la fase S.

fase M Fase mitótica del ciclo celular.

fase S Período de la interfase del ciclo celular en el que se produce la síntesis del DNA.

fenilcetonuria Enfermedad metabólica humana producida por una mutación en un gen que determina una enzima que degrada la fenilalanina; provoca retraso mental cuando no se aplica el tratamiento adecuado; se hereda de forma autosómica recesiva.

fenocopia Fenotipo inducido por agentes ambientales que se asemeja al fenotipo producido por una mutación.

fenotipo (1) Forma que toma un carácter (o grupo de caracteres) en un individuo concreto. (2) Manifestación externa observable de un genotipo.

fenotipo autónomo Carácter genético de un organismo multicelular en el que únicamente las células genotípicamente mutantes exhiben el fenotipo mutante. Por el contrario, un carácter *no autónomo* es aquel en el que las células genotípicamente mutantes provocan que otras células (con independencia de su genotipo) manifiesten también el fenotipo mutante.

fenotipo dominante Fenotipo de un genotipo que incluye el alelo dominante; el fenotipo parental que se manifiesta en el heterocigoto.

fenotipo recesivo Fenotipo de un homocigoto para el alelo recesivo; fenotipo parental que no se expresa en el heterocigoto.

fibrosis quística Enfermedad humana de las glándulas secretoras, potencialmente letal; el síntoma más evidente consiste en un exceso de la secreción mucosa del pulmón; se hereda de forma autosómica recesiva.

ilamentos intermedios Clase heterogénea de elementos del citoesqueleto, cuyo diámetro es intermedio entre el diámetro de los microfilamentos y el de los microtúbulos.

iltro de nitrocelulosa Tipo de filtro empleado para fijar el DNA en experimentos de hibridación.

FISH (hibridación *in situ* fluorescente) (del inglés, *Fluorescence In situ Hybridization*). Técnica de hibridación *in situ* que utiliza una sonda unida a una molécula fluorescente.

isión binaria Proceso por el que una célula parental se divide en dos células hijas de tamaños aproximadamente iguales.

Met *Véase* **formil-metionina.**

ormación de patrón Proceso de desarrollo que culmina en la forma y estructura de los organismos superiores.

ormil-metionina (fMet) Aminoácido especial que se incorpora en primer lugar de la cadena polipeptídica durante la síntesis de proteínas en los procariotas.

ragmento de Okazaki Pequeño segmento de DNA unicatenario que se sintetiza como parte de la cadena retrasada durante la replicación del DNA.

recuencia alélica Medida de la abundancia de un alelo en una población; proporción en la población de todos los alelos de un gen que son de un tipo concreto.

recuencia de recombinación (RF) Proporción (o porcentaje) de las células o individuos recombinantes.

recuencia génica *Véase* **frecuencia alélica.**

uente de carbono Nutriente (como un azúcar) que proporciona los «esqueletos» de carbono necesarios para la síntesis de las moléculas orgánicas en un organismo.

unción de distribución Representación gráfica de alguna medida cuantitativa precisa de un carácter frente a sus frecuencias de aparición.

unción de mapa Fórmula que expresa la relación entre la distancia en un mapa de ligamiento y la frecuencia de recombinación.

usión Desnaturalización del DNA.

usión génica Unión accidental de DNA de dos genes, como la que ocurre en una translocación. Puede dar lugar a una proteína híbrida o a la regulación incorrecta de la unidad transcripcional de uno de los genes por la acción de elementos reguladores en *cis* (intensificadores) del otro.

G Guanina o guanosina.

gameto Célula haploide especializada que se fusiona con un gameto del sexo o tipo sexual opuesto para formar un cigoto diploide; en mamíferos, un óvulo o un espermatozoide.

gametofito Estado productor de gametos haploides en el ciclo de vida de las plantas; prominente e independiente en algunas especies, pero reducido o parásito en otras.

gastrulación Primeros movimientos e invaginaciones de la capa de células de un embrión animal temprano; normalmente, sigue inmediatamente a la formación de la blástula (o blastodermo).

gen Unidad fundamental, física y funcional, de la herencia, que transmite la información de una generación a la siguiente; porción de DNA compuesto de una región que se transcribe y una secuencia reguladora que hace posible la transcripción.

gen candidato Secuencia génica de función previamente desconocida que, por su posición en el cromosoma o alguna otra propiedad, se convierte en candidato para ser responsable de una función determinada, tal como la determinación de una enfermedad.

gen cardinal Genes de *Drosophila*, de expresión cigótica, que intervienen en la formación de patrón y responden directamente a los gradientes de información posicional anterior-posterior y dorsal-ventral creados por los genes de formación de patrón de expresión materna.

gen de expresión cigótica Gen que se expresa sólo tras la formación del cigoto, y cuyo producto no está incluido entre los aportados por la madre al oocito.

gen de expresión específica de tejido Expresión de un gen en un subconjunto reproducible de tejidos y células concretos, durante el desarrollo de un eucariota superior.

gen de la regla de los pares En *Drosophila*, miembro de una clase de genes de expresión cigótica que actúan en una fase intermedia del proceso de establecimiento del número correcto de segmentos. Mutaciones en estos genes tienen la mitad del número normal de segmentos, perdiendo uno sí y otro no de los mismos.

gen de polaridad segmental En *Drosophila*, miembro de una clase de genes que contribuye a las acciones finales que establecen el número correcto de segmentos. Mutaciones en estos genes producen la pérdida de una parte comparable de cada uno de los segmentos del cuerpo.

gen delator (chivato) *Véase* **gen testigo.**

gen estructural Gen que determina la secuencia de aminoácidos de una proteína.

gen gap En *Drosophila*, clase de genes cardinales que se activan en el cigoto en respuesta a gradientes anteroposteriores de información posicional. Mediante su efecto regulador sobre los genes de la regla de los pares y de los genes homeóticos, los patrones de expresión de los distintos productos génicos gap determinan el número y tipo correctos de segmentos corporales. Las mutaciones gap provocan la pérdida de varios segmentos corporales adyacentes.

gen hemicigótico Gen presente en una sola copia en un organismo diploide; por ejemplo, los genes ligados al cromosoma X en un macho de mamífero.

gen modificador Gen que afecta a la expresión fenotípica de otro gen.

gen subvital Gen que causa la muerte de una cierta proporción de los individuos que lo expresan, pero no de todos ellos.

gen supresor de tumor Gen que determina una proteína que suprime la formación de tumores. Se piensa que los alelos silvestres de los genes supresores de tumores funcionan como reguladores negativos de la proliferación celular.

gen testigo Gen cuya expresión fenotípica es fácil de detectar y se utiliza para estudiar, en los transgenes, las actividades específicas de tejido de los promotores y los intensificadores.

gen transformador viral Gen de un genoma viral que puede inducir la proliferación anormal de células cultivadas y, de forma similar, puede inducir la formación de tumores en animales completos infectados.

generación F_1 Primera generación filial, producto del cruzamiento de dos líneas parentales.

generación F_2 Segunda generación filial, producto de la autofecundación o la fecundación cruzada de individuos de la F_1.

generaciones filiales Generaciones sucesivas de descendientes en una serie controlada de cruzamientos iniciada con dos parentales concretos (generación P) y seguida de cruces por autofecundación o fecundación cruzada de los descendientes de cada nueva generación (F_1, F_2, ...).

genes de histocompatibilidad Genes que determinan los antígenos de histocompatibilidad.

genes duplicados Dos pares génicos idénticos en un individuo diploide.

genes homeóticos Genes que controlan el destino de los segmentos a lo largo del eje anteroposterior de los animales superiores.

genes parálogos Dos genes de una misma especie que han evolucionado por duplicación génica.

genes reguladores Genes cuya función es conectar o desconectar la transcripción de los genes estructurales.

Genética (1) El estudio de los genes. (2) El estudio de la herencia.

Genética de las células somáticas Genética asexual; incluye el estudio de las mutaciones somáticas, su segregación y recombinación, así como el de las fusiones celulares.

Genética de transmisión Estudio de los mecanismos que contribuyen al paso de los genes desde una generación a la siguiente.

Genética molecular Estudio de los procesos moleculares que subyacen en la estructura y función de los genes.

Genética inversa Metodología experimental que comienza con un segmento clonado de DNA o con una secuencia proteica, y lo utiliza (mediante mutagénesis dirigida) para introducir mutaciones programadas en el genoma y deducir así la función del gen.

genoma Material genético completo de una dotación cromosómica.

Genómica Clonación y caracterización de genomas completos.

Genómica estructural Caracterización y localización de todos los genes de un genoma.

Genómica funcional Estudio de los patrones de expresión y de las interacciones génicas de todo el genoma.

genoteca Colección de clones de DNA obtenida a partir de un DNA donante.

genoteca de cDNA Genoteca compuesta de cDNA en la que no están necesariamente representados todos los mRNA.

genoteca de expresión Genoteca realizada con un vector que lleva señales transcripcionales que permiten la producción del mRNA correspondiente a cualquier inserto de DNA y, en última instancia, la obtención del producto proteico.

genoteca genómica Genoteca que comprende un genoma completo.

genotipo Composición alélica específica de una célula, bien referida al total de su genoma o, más comúnmente, a un gen determinado o a un conjunto de genes.

ginandromorfo Individuo formado por un mosaico de estructuras masculinas y femeninas. La causa subyacente suele ser la heterogeneidad en la dotación de cromosomas sexuales, de forma que algunas células son cromosómicamente hembras y otras machos.

Gln Glutamina (aminoácido).

Glu Ácido glutámico (aminoácido).

Gly Glicina (aminoácido).

gradiente Cambio gradual en alguna propiedad cuantitativa a lo largo de una distancia concreta.

gránulos polares Gránulos citoplásmicos localizados en el polo posterior de un oocito de *Drosophila* y del embrión temprano. Están relacionados con la línea germinal y con los determinantes posteriores.

grupo de equivalencia Conjunto de células inmaduras que poseen el mismo potencial de desarrollo. En muchos casos, células de un mismo grupo de equivalencia acaban adoptando distintos destinos de desarrollo.

grupo de ligamiento Grupo de genes ligados; un cromosoma.

guanina Base púrica que empareja con la citosina.

guanosina Nucleósido cuya base nitrogenada es la guanina.

halo de lisis Área clara en un césped de bacterias, producida por la lisis de las bacterias por las infecciones sucesivas de un fago y sus descendientes.

haploide Célula con una sola dotación cromosómica, u organismo compuesto de tales células.

haploidización Producción de un haploide a partir de un diploide por la pérdida progresiva de cromosomas.

haploinsuficiente Gen que, hallándose en una sola copia (dosis) en una célula diploide, no es capaz de generar la actividad funcional silvestre.

haplosuficiente Gen que, hallándose en una sola copia (dosis) en una célula diploide, puede generar la actividad funcional silvestre.

hecho mutacional Ocurrencia real de una mutación en el tiempo y en el espacio.

helicasa Enzima que rompe puentes de hidrógeno del DNA y lo desenrolla durante el avance de la horquilla de replicación.

hemofilia Enfermedad humana caracterizada por un fallo en la coagulación de la sangre. Se debe a una mutación en un gen que determina una proteína de la coagulación, y se hereda como un carácter recesivo y ligado al X.

hemoglobina (Hb) Proteína transportadora de oxígeno en la sangre de la mayoría de los animales.

heredabilidad en sentido amplio *Véase* **heredabilidad general**.

heredabilidad en sentido estricto (h^2) Proporción de la varianza fenotípica que puede atribuirse a la varianza genética aditiva.

heredabilidad estricta *Véase* **heredabilidad en sentido estricto**.

heredabilidad general (H^2) Proporción de la varianza fenotípica total de una población que se debe a la varianza genética.

heredabilidad manifiesta Cociente entre el progreso obtenido en una generación de selección y la selección diferencial aplicada a los parentales.

herencia citoplásmica Herencia debida a los genes localizados en los orgánulos citoplásmicos.

herencia compleja Patrón de variación de los caracteres discontinuos que puede explicarse únicamente por la interacción de varios genes con factores ambientales.

herencia cruzada Transmisión de un gen desde un parental masculino a alguna de sus hijas y de éstas a alguno de sus nietos. Por ejemplo, la herencia ligada al X.

herencia epigenética Procesos mediante los que ocurren modificaciones heredables de la función génica, que no se deben, sin embargo, a cambios en la secuencia de bases del DNA del organismo. Ejemplos de herencia epigenética son la paramutación, la inactivación del cromosoma X y la impronta parental.

herencia materna Forma de herencia uniparental en la que todos los descendientes poseen el genotipo y el fenotipo del progenitor femenino.

herencia matroclínea Forma de herencia en la que toda la descendencia tiene su fenotipo determinado por el núcleo de la madre.

herencia mezclada Modelo de herencia ya desacreditado que proponía que las características de un individuo son el resultado de la mezcla homogénea de influencias «fluidas» de sus progenitores.

herencia particulada Modelo de herencia que propone que la información genética se transmite desde una generación a la siguiente en unidades discretas («partículas»), de forma que las características de la descendencia no derivan de la mezcla homogénea de fluidos de los progenitores (*compárese* con **herencia mezclada**).

herencia patroclínea Forma de herencia en la que toda la descendencia tiene su fenotipo determinado por el núcleo del padre.

herencia uniparental Transmisión de ciertos fenotipos desde uno de los progenitores a toda la descendencia; esta clase de herencia se debe normalmente a orgánulos celulares.

hermafrodita (1) Especie vegetal que posee órganos masculinos y femeninos en la misma flor o en el mismo individuo (*compárese* con **planta monoica**). (2) Animal con órganos sexuales tanto masculinos como femeninos.

heterocigosidad Medida de la variabilidad genética de una población; respecto a un locus concreto, se define como la frecuencia de heterocigotos para ese locus.

heterocigoto Individuo con un par génico en heterocigosis.

heterocarionte Cultivo de células que contienen dos tipos distintos de núcleos en un citoplasma común.

heterocromatina Regiones cromosómicas condensadas que se tiñen intensamente, de las que se cree que, en su mayor parte, son genéticamente inertes.

heterocromatina constitutiva Regiones concretas de heterocromatina que están siempre presentes y se observan en los dos cromosomas homólogos.

heterocromatina facultativa Heterocromatina situada en regiones compuestas de eucromatina en otros individuos de la misma especie, o incluso en el otro cromosoma homólogo.

heterodúplice DNA de doble cadena formado por la reasociación de dos cadenas sencillas de distinto origen; si existe una diferencia estructural entre las cadenas, el heterodúplice puede manifestar anormalidades tales como lazos o bucles.

heteroplasmonte Célula que contiene una mezcla de dos tipos de citoplasmas genéticamente distintos y, generalmente, con mitocondrias o cloroplastos diferentes.

hexaploide Célula que contiene seis dotaciones cromosómicas, u organismo compuesto de tales células.

hibridación de DNA Asociación espontánea de dos moléculas de DNA de cadena sencilla para formar una doble hélice.

hibridación *in situ* Localización de un gen mediante la adición de sondas radiactivas específicas para dicho gen y la detección de la radiactividad sobre el cromosoma tras la hibridación.

hibridación *in situ* de RNA Técnica empleada para identificar el patrón espacial de expresión de un transcrito particular (generalmente un mRNA). En esta técnica, se marca la sonda de DNA, ya sea radiactivamente o uniéndole químicamente una enzima que convierte un sustrato en un pigmento visible. Un tejido o un organismo completo se sumerge en una solución de la sonda de DNA, de cadena sencilla, en condiciones que permiten su hibridación con el RNA de las células; a continuación, se elimina el DNA que no ha hibridado. La sonda radiactiva se detecta mediante autorradiografía. La sonda marcada con la enzima se detecta bañando el tejido en el sustrato; se pigmentarán únicamente los sitios en los que se haya expresado el transcrito de interés.

hibridar (1) Producir un híbrido tras la realización de un cruzamiento. (2) Renaturalizar cadenas de un ácido nucleico procedentes de orígenes distintos.

híbrido (1) Heterocigoto. (2) Descendencia individual de cualquier cruzamiento entre parentales de distinto genotipo.

híbrido irradiado Tipo de célula híbrida hombre-ratón en la que los cromosomas humanos han sido fragmentados mediante radiación para determinar los marcadores que se heredan juntos y que, por tanto, están ligados.

hidroxiapatita Forma de fosfato cálcico que une DNA de doble cadena.

hifa Estructura filamentosa (hecha de células unidas por sus extremos) que forma el tejido principal de muchas especies de hongos.

Himalaya Fenotipo de la piel de los mamíferos dependiente de la temperatura; generalmente, albino con pigmentación sólo en las puntas de las orejas, pies y cola.

hiperactivación del X En *Drosophila*, mecanismo mediante el que los genes estructurales del cromosoma X de los machos se transcriben con la misma intensidad que los dos cromosmas X de las hembras juntos.

hiperploide Aneuploide que contiene un número pequeño de cromosomas adicionales.

hipoploide Aneuploide que carece de un número pequeño de cromosomas.

hipótesis de las múltiples mutaciones Propuesta de que una célula debe experimentar varios hechos mutacionales para transformarse en célula maligna o cancerosa.

hipótesis de los factores múltiples Hipótesis que explica la variación cuantitativa mediante la interacción de un gran número de genes (poligenes), cada uno con un efecto aditivo pequeño sobre el carácter.

His Histidina (aminoácido).

histograma de frecuencias Gráfica «en escalones» en la que se representan las frecuencias de varias clases agrupadas arbitrariamente.

histona Tipo de proteína de carácter básico que forma las unidades (nucleosomas) alrededor de las cuales se enrolla el DNA de los cromosomas eucarióticos.

homeobox (secuencia homeótica) Familia de secuencias de DNA muy similares, de unos 180 pares de bases, que determina una secuencia polipeptídica denominada homeodominio o dominio homeótico (un dominio de unión a una secuencia específica de DNA). Aunque se descubrió inicialmente en los genes homeóticos, hoy sabemos que está presente en una gama mucho más amplia de genes que cifran proteínas de unión a DNA.

homeodominio (dominio homeótico) Familia muy conservada de secuencias de unos 60 aminoácidos, presente en gran número de factores de transcripción; forma estructuras hélice-giro-hélice y se une al DNA de forma específica de secuencia.

homeosis Sustitución de una parte del cuerpo por otra. Puede deberse a agentes ambientales que provocan alguna anomalía del desarrollo o a una mutación.

homocigoto Individuo con un par génico en homocigosis.

homólogo Uno de los miembros de una pareja de cromosomas homólogos.

hongo heterotálico Especie de hongo que requiere la fusión de dos tipos sexuales distintos para llevar a cabo el ciclo sexual completo.

hongo homotálico Especie de hongo en la que una sola espora sexual puede realizar el ciclo sexual completo (*compárese* con **hongo heterotálico**).

hormona Molécula que se secreta al sistema circulatorio por un órgano endocrino y actúa como señal de acción a larga distancia, mediante la activación de receptores presentes en la superficie o dentro de las células dianas.

hormona esteroide Clase de hormonas sintetizadas en glándulas del sistema endocrino que, gracias a su naturaleza no polar, pueden atravesar con facilidad la membrana plasmática de las células. Actúan mediante su unión a factores de transcripción llamados receptores de hormonas esteroides, produciendo la activación de éstos.

horquilla de replicación Punto en el que se separan las dos cadenas de DNA para permitir la replicación de cada una de ellas.

huella digital del DNA Patrón de bandas autorradiográficas específicas para cada individuo que se obtiene cuando el DNA se digiere con una enzima de restricción que corta en las secuencias adyacentes a una

familia de VNTR y, a continuación, se utiliza la técnica Southern, empleando una sonda específica de VNTR.

huella electroforética Patrón característico de manchas que se obtiene tras la electroforesis de los fragmentos polipeptídicos resultantes de la digestión de una proteína concreta con una enzima proteolítica.

huso Conjunto de fibras de microtúbulos que parecen tirar de los cromosomas eucarióticos durante la división.

Ig (inmunoglobulina) *Véase* **anticuerpo**.

Ile Isoleucina (aminoácido).

imago Insecto adulto.

impronta parental Fenómeno epigenético en el que la actividad de un gen depende de si se ha heredado del padre o de la madre. Algunos genes son de impronta materna y otros paterna.

in situ «En su sitio o lugar»; *véase* **hibridación *in situ***.

in vitro En una situación experimental, fuera del organismo (literalmente, «en vidrio»).

in vivo En una célula u organismo vivo.

inactivación del cromosoma X Proceso mediante el que los genes de un cromosoma X de una célula de mamífero pueden estar completamente reprimidos, como parte del mecanismo de compensación de dosis. *Véase también* **compensación de dosis** y **corpúsculo de Barr**.

inactivación dirigida de un gen En inglés, *knockout*. Inactivación de un gen específico. Igual a **interrupción génica**. La mutación nula se introduce en el gen mediante la mutagénesis dirigida de un fragmento clonado de DNA que es entonces introducido en el genoma a través de recombinación homóloga, consiguiéndose la sustitución del alelo normal.

individuo de prueba Individuo homocigótico para uno o más alelos recesivos; se utiliza en los cruzamientos de prueba.

inducción Liberación de la represión de un gen o conjunto de genes sometidos a regulación negativa.

inducción cigótica Liberación repentina de un fago lisogénico del cromosoma de una célula Hfr cuando el profago entra en una F^-, y lisis posterior de la célula receptora.

inductor Agente ambiental que provoca la transcripción de un operón.

infección doble Infección de una bacteria con dos fagos genéticamente distintos.

información posicional Proceso mediante el que se establecen las señales químicas que especifican el destino celular a lo largo de un eje geográfico de un embrión en desarrollo o de un primordio de tejido.

inhibición lateral Señal emitida por una célula que impide a las células adyacentes que adquieran su destino de desarrollo.

inmunoglobulina *Véase* **anticuerpo**.

inmunohistoquímica Utilización de anticuerpos o antisueros como instrumentos para identificar patrones de distribución de proteínas en un tejido u organismo. El anticuerpo (o mezcla de anticuerpos) que reconoce a una proteína concreta se etiqueta con una enzima que convierte un sustrato en un pigmento visible. Se incuba el anticuerpo con el tejido, se lava el que no está unido y se añade el sustrato enzimático, poniéndose así de manifiesto el patrón de distribución de la proteína (en realidad, el antígeno unido a ella).

inosina Base nitrogenada rara, importante en la posición de tambaleo de los anticodones de algunos tRNA.

integración ectópica En un organismo transgénico, la inserción del gen introducido en un sitio distinto a su propio locus.

intensificador Secuencia reguladora en *cis* que estimula la transcripción de un promotor adyacente. En los organismos eucarióticos, muchos *intensificadores específicos de tejido* determinan patrones espaciales de expresión génica. Los intensificadores pueden actuar sobre promotores alejados muchas decenas de kilobases en el DNA, y pueden estar situados a uno u otro lado (5' ó 3') del promotor que regulan.

interacción génica Colaboración de varios genes diferentes en la aparición de un carácter fenotípico (o grupo de caracteres relacionados).

interacción inductiva Interacción entre dos grupos de células en las que una señal procedente de uno de los grupos provoca un cambio en el estado (o destino) de desarrollo del otro grupo de células.

interacción ligando-receptor Interacción entre una molécula (normalmente de origen extracelular) y una proteína presente en la superficie o dentro de la célula. Una interacción de este tipo es la que se produce entre las hormonas esteroides y sus receptores citoplásmicos o nucleares. Otra es la que se produce entre ligandos polipeptídicos secretados y receptores transmembrana.

intercambio entre cromátidas hermanas (SCE) Hecho similar al entrecruzamiento que puede ocurrir entre cromátidas hermanas, durante la mitosis o la meiosis; se detecta en los cromosomas en arlequín.

interfase Estadio del ciclo celular entre dos divisiones nucleares, en el que los cromosomas están extendidos y en funcionamiento.

interferencia Medida del grado de independencia de los entrecruzamientos que se calcula sustrayendo el coeficiente de coincidencia del valor 1.

interferencia de cromátidas Situación en la que puede demostrarse que la ocurrencia de un entrecruzamiento entre dos cromátidas no hermanas afecta a la probabilidad de que esas mismas cromátidas participen en otros entrecruzamientos en la misma meiosis.

interrupción génica Inactivación de un gen mediante integración en el mismo de un fragmento de DNA diseñado para ese propósito con técnicas de ingeniería genética. Igual a **inactivación dirigida de un gen**.

intrón *Véase* **secuencia interruptora**.

inversión Mutación cromosómica que consiste en la rotura de un trozo de cromosoma, una rotación de 180 grados y su nueva inserción en el mismo sitio.

inversión paracéntrica Inversión que no incluye al centrómero.

inversión pericéntrica Inversión que incluye al centrómero.

IR *Véase* **secuencia repetida invertida**.

IS *Véase* **secuencia de inserción**.

isótopo Una de las varias formas de un átomo que poseen el mismo numero atómico pero distinta masa atómica.

kb *Véase* **kilobase**.

kilobase 1000 pares de nucleótidos.

λdgal Un fago λ que lleva un gen *gal* bacteriano, siendo defectivo (*d*) para alguna función del fago.

lesión Área dañada de un gen (sitio mutado), un cromosoma o una proteína.

Leu Leucina (aminoácido).

líder Porción no traducida del extremo 5' de un mRNA, situado entre el punto de inicio de la transcripción y el de la traducción.

ligamiento Asociación de genes en un mismo cromosoma.

ligamiento al sexo Localización de un gen en un cromosoma sexual.

ligamiento al X Patrón de herencia de los genes situados en el cromosoma X y no en el Y.

igamiento al X y al Y Patrón de herencia de los genes situados tanto en el cromosoma X como en el Y (raro).

igamiento al Y Patrón de herencia de los genes situados en el cromo-oma Y y no en el X (raro).

igasa Enzima capaz de volver a unir un enlace fosfodiéster roto de un cido nucleico.

inaje celular Pedigrí de células conectadas por divisiones asexuales ucesivas.

ínea germinal Linaje celular de un eucariota multitisular del que de-ivan los gametos.

infoma de Burkitt Cáncer del sistema linfático que se manifiesta me-iante tumores en la mandíbula. Está asociado con una translocación que usiona un oncogén específico con los elementos reguladores de uno de os genes de inmunoglobulinas.

.INE (del inglés, *Long INterspersed Element*) Una clase de segmentos argos de DNA repetido que se encuentran dispersos por todo el genoma.

nea Grupo de organismos diploides o poliploides idénticos, de cons-tución homocigótica, que se distinguen de otros individuos de la misma specie por alguna característica genotípica y fenotípica.

nea (estirpe o raza) pura Grupo de individuos idénticos que produ-en siempre descendencia del mismo fenotipo cuando se cruzan entre sí.

sis Rotura y muerte de una célula bacteriana como resultado de la beración de una progenie de fagos.

sógeno *Véase* **bacteria lisogénica**.

cus (plural, **loci**) *Véase* **locus génico**.

cus de un carácter cuantitativo Posición de un gen cuyos alelos ontribuyen a la variación cuantitativa de algún rasgo (carácter).

cus génico Sitio preciso de un cromosoma donde está situado un gen.

ys Lisina (aminoácido).

acromolécula Polímero de gran tamaño, como el DNA, una proteí- o un polisacárido.

anx Fenotipo de falta de cola de los gatos, debido a una mutación tosómica dominante que resulta letal en homocigosis.

apa cromosómico *Véase* **mapa de ligamiento**.

apa de desnaturalización Mapa de un segmento de DNA que mues- las posiciones de lazos de desnaturalización local, los cuales corres-nden a regiones de elevado contenido en pares AT.

apa de destino Mapa de un embrión en el que se muestran las áreas stinadas a desarrollarse en tejidos y órganos adultos concretos.

apa de focos Mapa de destino de las áreas del blastodermo de *Dro-phila* destinadas a desarrollar estructuras adultas concretas, basado en frecuencia con que aparecen determinadas clases de mosaicos.

apa génico Asignación lineal de sitios mutados dentro de un gen, sada en las frecuencias de recombinación interalélica (intragénica).

pa de ligamiento Mapa cromosómico; mapa abstracto de loci cro-sómicos basado en frecuencias de recombinación.

pa de restricción Mapa de una región cromosómica que muestra posiciones de las dianas de uno o más enzimas de restricción.

rca molecular Uso de un fragmento de DNA exógeno o de un nsposón para etiquetar un gen, de tal forma que podamos reconocer en genoteca un clon que lleve el gen con la marca.

rcador *Véase* **marcadores genéticos**.

rcadores genéticos Alelos empleados como instrumento experi-ntal para seguir la pista de un individuo, un tejido, una célula, un leo, un cromosoma o un gen.

Véase **megabase**.

media Media aritmética.

medio Cualquier material sobre el que (o en el que) se hace proliferar un cultivo experimental.

medio ambiente Combinación de todas las condiciones externas al genoma de un organismo que pueden afectar a la expresión de los genes.

medio mínimo Medio que contiene únicamente sales inorgánicas, una fuente de carbono y agua.

megabase (Mb) Un millón de pares de nucleótidos.

meiocito Célula en la que se produce la meiosis.

meiospora Célula que es uno de los productos de la meiosis en las plantas.

meiosis Dos divisiones nucleares sucesivas (con las divisiones celula-res correspondientes) que dan lugar a los gametos (en los animales) o las esporas sexuales (en las algas y los hongos), que contienen la mitad del material genético de la célula original.

mejora genética animal Aplicación práctica del análisis genético al desarrollo de líneas de animales domésticos mejor adaptadas a las nece-sidades humanas.

mejora genética vegetal Aplicación práctica del análisis genético al de-sarrollo de líneas de plantas mejor adaptadas a las necesidades humanas.

mejora por mutación Uso de mutágenos para desarrollar variedades agrícolas de mayor rendimiento.

mella Resultado de la acción de una nucleasa cuando rompe en un sitio concreto del esqueleto de azúcar fosfato de una cadena de DNA.

merocigoto Célula de *E. coli* parcialmente diploide, que consta de un cromosoma completo (el endogenote) y un fragmento cromosómico adi-cional (el exogenote).

Met Metionina (aminoácido).

metabolismo Reacciones químicas que se producen en una célula viva.

metafase Fase intermedia de la división nuclear en la que los cromo-somas se alinean a lo largo del plano ecuatorial de la célula.

metámero Unidad segmental repetida de los animales superiores.

metilación Modificación de una molécula mediante la adición de un grupo metilo.

mezcla S9 Sobrenadante del extracto de hígado que se utiliza en el test de Ames para activar o inactivar mutágenos.

microfilamentos Conjunto de las fibras más finas del citoesqueleto. Los microfilamentos están formados por polímeros de actina.

microtúbulos Conjunto de las fibras más anchas del citoesqueleto. Los microtúbulos se componen de subunidades de tubulina polimeriza-das que forman un tubo hueco.

mieloma Cáncer de médula ósea.

migración del punto de intersección Proceso por el que una cadena «invasora» de DNA extiende su emparejamiento parcial con su cadena complementaria conforme va desplazando a la cadena residente.

mitocondria Orgánulo eucariótico donde se produce la síntesis de ATP y el ciclo del ácido cítrico.

mitosis Tipo de división nuclear, que tiene lugar durante la división de la célula, en la que se producen dos núcleos hijos idénticos al núcleo original.

moda Clase única de una distribución estadística a la que corresponde la mayor frecuencia.

modelo de casete Modelo que explica la interconversión del tipo se-xual en las levaduras. Se asume que las informaciones para los dos tipos sexuales, *a* y *α*, están presentes en forma de «casetes» silenciosas; una copia de uno u otro tipo de casete se puede trasladar al locus sexual, donde es «escuchada» (transcrita).

modelo de elección de la copia Modelo del mecanismo de entrecruzamiento, no apoyado por la evidencia experimental, que propone que los entrecruzamientos suceden durante la división cromosómica, teniendo lugar únicamente entre dos cromátidas no hermanas nuevas.

modelo del DNA heterodúplice Modelo para explicar tanto el entrecruzamiento como la conversión génica, que propone la aparición de un tramo corto de DNA heterodúplice (formado con DNA de ambos parentales) en la cercanía de un quiasma.

molde «Troquel» o «molde» molecular que conforma la estructura o la secuencia de otra molécula; por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del DNA actúa como molde durante la transcripción para dirigir la secuencia de nucleótidos del RNA.

monofosfato cíclico de adenosina *Véase* **cAMP**.

monoploide Célula que posee una única dotación cromosómica (generalmente como aberración) o un organismo compuesto de tales células.

monosómico Célula o individuo que es básicamente diploide, pero que sólo tiene una copia de un tipo determinado de cromosoma y que, por lo tanto, su dotación cromosómica es $2n - 1$.

morfógeno Molécula que induce la adquisición de distintos destinos celulares, dependiendo de la concentración de morfógeno a la que se exponen las células.

mosaico Quimera; tejido que contiene dos o más tipos celulares genéticamente distintos o un individuo que tenga dichos tejidos.

mRNA (RNA mensajero) Molécula de RNA transcrita del DNA de un gen cuya traducción en los ribosomas genera una proteína.

mRNA monocistrónico mRNA que determina una sola proteína.

mRNA policistrónico mRNA que determina más de una proteína.

mtDNA DNA mitocondrial.

multiplicidad de infección Número medio de partículas de fago que infectan a cada célula bacteriana en un experimento concreto.

mutación condicional Mutación que da lugar a fenotipo silvestre en ciertas condiciones ambientales (permisivas) y a fenotipo mutante en otras condiciones (restrictivas).

m.u. *Véase* **unidad de mapa**.

mutación (1) Proceso que produce un gen o una dotación cromosómica distinta de la silvestre; (2) Gen o dotación cromosómica que resulta de dicho proceso.

mutación cromosómica Cualquier tipo de cambio en la estructura o el número de los cromosomas.

mutación de cambio de fase Inserción o deleción de uno o pocos pares de bases que desplaza la fase de lectura de la traducción.

mutación de cambio de sentido Mutación que altera un codón de manera que ahora determina un nuevo aminoácido distinto del original.

mutación de ganancia de función Mutación que da lugar a que una proteína adquiera una nueva capacidad funcional que es detectable fenotípicamente.

mutación directa Mutación que convierte un alelo silvestre en uno mutante.

mutación en un segundo sitio Segunda mutación que se produce en un gen; en ciertos casos, esta segunda mutación suprime el efecto de la primera, de manera que el mutante doble tiene fenotipo silvestre.

mutación espontánea Mutación que se produce en ausencia de mutágenos, se debe generalmente a errores en el funcionamiento normal de los enzimas celulares.

mutación génica Mutación puntual que se produce por cambios en la estructura de un gen.

mutación homeótica Mutación que cambia el destino en el desarrollo de un disco imaginal.

mutación inestable Mutación con una elevada frecuencia de reversión; mutación producida por la inserción de un elemento controlador cuya posterior salida da lugar a la reversión.

mutación nula Mutación cuya consecuencia es la ausencia completa de la función del gen.

mutación polar Mutación que afecta a la transcripción o la traducción de un gen o de un operón tan sólo hacia uno de los lados del sitio mutado; por ejemplo, mutaciones sin sentido, cambios de fase y mutaciones inducidas por elementos IS.

mutación puntual Mutación localizada en un locus concreto.

mutación sensible a la temperatura Mutación condicional que produce el fenotipo mutante en un rango de temperaturas y el fenotipo silvestre en otro rango distinto.

mutación silenciosa Mutación que no altera la función del producto proteico del gen.

mutación sin sentido Mutación que altera un gen al generar un codón sin sentido.

mutación somática Mutación que tiene lugar en una célula somática.

mutación supresora Mutación que contrarresta los efectos de otra mutación. La mutación supresora se localiza en un sitio distinto de la mutación a la cual contrarresta, bien en el mismo gen o en un locus alejado. Distintas mutaciones supresoras actúan de diferentes maneras.

mutaciones germinales Mutaciones que ocurren en las células destinadas a convertirse en gametos.

mutación neutra Mutación hacia un alelo que no difiere en su efecto fisiológico del alelo original lo suficiente como para verse afectado por la selección natural.

mutación pleiotrópica Mutación que afecta a varios caracteres distintos.

mutación rezumante Mutación que confiere fenotipo mutante, si bien deja la función normal del gen a un nivel todavía detectable, aunque bajo.

mutagénesis de saturación Inducción y recolección de un gran número de mutaciones en una región del genoma o que afectan a una función concreta, con la esperanza de identificar todos los genes de esa región o que afectan a dicha función.

mutagénesis dirigida Alteración de una parte determinada de un gen clonado e introducción del gen modificado en el organismo.

mutagénesis *in vitro* Producción de mutaciones aleatorias o específicas en un fragmento de DNA clonado. Típicamente, se trata de DNA destinado a ser introducido de nuevo en una célula u organismo para comprobar el efecto de la mutagénesis.

mutágeno Agente capaz de incrementar la tasa de mutación.

mutante Organismo o célula portador de una mutación.

mutón Porción más pequeña de un gen que puede verse implicada en un hecho mutacional; hoy sabemos que corresponde a un par de nucleótidos.

nanómetro 10^{-9} metros.

neurofibromatosis Enfermedad humana caracterizada por la formación de tumores de células nerviosas y manchas de color café con leche (*café au lait*), ambos en la piel. El alelo aparece normalmente por una nueva mutación en la línea germinal, y se hereda de forma autosómica dominante.

Neurospora Hongo de color rosa que crece habitualmente sobre alimentos en descomposición.

neutralidad *Véase* **neutralidad selectiva**.

neutralidad selectiva Situación en la que diferentes alelos de un gen confieren igual aptitud darwiniana.

o autónomo *Véase* **fenotipo autónomo.**

o disyunción Fallo en la separación correcta de los cromosomas ho-
mólogos (durante la meiosis) o las cromátidas hermanas (durante la mi-
osis) hacia los polos opuestos de la célula.

orma de reacción Serie de fenotipos distintos generados por un ge-
otipo concreto bajo diferentes condiciones ambientales.

orthern Transferencia de moléculas de RNA separadas mediante
ectroforesis desde un gel a una hoja de material absorbente, que es
añada posteriormente en un tampón que contiene una sonda marcada
ue se unirá al RNA de interés.

ucleasa Enzima que puede degradar DNA mediante la rotura de sus
nlaces fosfodiésteres.

ucleoide Masa de DNA dentro de los cloroplastos y las mitocondrias.

ucléolo Orgánulo localizado en el núcleo, que contiene rRNA y múl-
ples copias de los genes de rRNA que se han generado por amplifica-
ión.

ucleósido Base nitrogenada unida a una molécula de azúcar.

ucleosoma Copúsculo nu: unidad básica de la estructura del cromo-
oma eucariótico; se trata de una esfera constituida por ocho moléculas
e histonas, alrededor de la cual el DNA da casi dos vueltas.

ucleótido Molécula compuesta por una base nitrogenada, un azúcar y
n grupo fosfato; se trata del elemento estructural básico de los ácidos
ucleicos.

ulisómico Célula o individuo que carece de un tipo de cromosoma,
endo su número de cromosomas $n - 1$ ó $2n - 1$.

ctada Asca que contiene ocho ascosporas, que se produce en aquellas
pecies en las que la tétrada sufre una división mitótica después de la
eiosis.

igonucleótido Fragmento pequeño de DNA sintético.

ncogén Gen que contribuye a la aparición de un cáncer. Generalmen-
, los oncogenes son formas mutadas de genes normales.

perador Región de DNA situada en el extremo de un operón que
túa como sitio de unión de una proteína represora.

perón Conjunto de genes estructurales adyacentes cuyo mRNA se
ntetiza en un solo tipo de molécula, más las señales reguladoras adya-
ntes que afectan a la transcripción de dichos genes estructurales.

RF (tramo de lectura abierta) (del inglés, *Open Reading Frame*)
ramo de un segmento secuenciado de DNA que comienza con un co-
n de inicio de la traducción y finaliza con un codón de terminación;
trata, presumiblemente, de la porción de un gen que determina la
oteína.

ganismo transgénico Organismo cuyo genoma ha sido modificado
ediante la aplicación externa de nuevo DNA.

ganizador nucleolar Región (o regiones) de la dotación cromosó-
ica que están asociadas físicamente al nucléolo y contienen genes de
NA.

ganogénesis Formación del sistema de órganos durante la embrio-
nesis animal.

gánulo Estructura subcelular que tiene una función especializada
por ejemplo, la mitocondria, el cloroplasto o el huso acromático—.

igen de replicación Tramo de secuencia específica en el que se ini-
a la replicación del DNA.

AC (cromosoma artificial derivado del fago P1) (del inglés, *P1-
sed Artificial Chromosome*) Derivado del fago P1, manipulado genéti-
camente para convertirlo en un vector de fragmentos de DNA de gran
tamaño.

paisaje adaptativo Superficie definida por una gráfica en tres dimen-
siones en la que un plano representa todas las posibles combinaciones de
las frecuencias alélicas de distintos loci y la tercera dimensión la aptitud
biológica.

par de nucleótidos (pareja de nucleótidos) Dos nucleótidos (uno en
cada cadena del DNA) enlazados por puentes de hidrógeno.

par génico Las dos copias de un gen particular presentes en una célula
diploide (una en cada dotación cromosómica).

par génico heterocigótico Par génico con alelos diferentes en los dos
cromosomas homólogos del individuo diploide; por ejemplo, *A/a* o
A_1/A_2.

par génico homocigótico Par génico con el mismo alelo en ambas
copias, por ejemplo, *A/A* o A_1/A_1.

paramutación Fenómeno epigenético de las plantas. La actividad de
un alelo normal se reduce de forma hereditaria, debido a que dicho alelo
ha estado en heterocigosis con un alelo especial «paramutagénico».

partenogénesis Producción de descendientes por una hembra sin con-
tribución genética del macho.

paseo con cebador Uso de un cebador diseñado a partir de un área del
genoma de secuencia conocida para secuenciar una región adyacente de
secuencia desconocida.

paseo cromosómico Método que permite la disección de grandes seg-
mentos de DNA, en el que un fragmento de DNA clonado, por lo general
eucariótico, se emplea para rastrear clones de DNA recombinante de la
misma genoteca en búsqueda de los que contengan secuencias vecinas.

patógeno Organismo causante de una enfermedad en otro organismo.

patrón de segregación en primera división Para un par génico con-
creto, una particular disposición lineal de los fenotipos de las esporas en
un asca, que se produce cuando los dos alelos se separan en núcleos
distintos durante la primera división meiótica, indicando así que no hubo
entrecruzamiento previo alguno entre el par alélico y el centrómero.

pedigrí «Árbol genealógico», dibujado con símbolos genéticos están-
dar, en el que se muestra el patrón de herencia de caracteres fenotípicos
concretos.

penetrancia Proporción de individuos con un genotipo concreto que
manifiestan dicho genotipo al nivel fenotípico.

péptido *Véase* **aminoácido.**

pérdida cromosómica Fallo en la incorporación de un cromosoma a
uno de los núcleos hijos durante la división celular.

petite Mutación de levadura que da lugar a colonias de pequeño tama-
ño y a funciones mitocondriales alteradas. En los petites citoplásmicos
(petites neutros y supresivos), la mutación es una deleción en el DNA
mitocondrial; en los petites segregacionales, la mutación está en el DNA
nuclear.

petite neutro Mutante petite que al ser cruzado por la estirpe silvestre
sólo genera descendencia silvestre.

petite segregacional Mutante petite que al ser cruzado con el silvestre
produce la mitad de la descendencia petite y la otra mitad normal; se
debe a una mutación nuclear.

petite supresivo Mutante petite que al ser cruzado con el silvestre pro-
duce una descendencia en la que una proporción variable, no mendelia-
na, son petites.

Phe Fenilalanina (aminoácido).

pico adaptativo Máximo (uno o quizá varios) de un paisaje adaptativo. La selección dirige el acervo genético de la población hacia el genotipo que corresponde a un pico adaptativo.

piebaldismo Fenotipo de los mamíferos que se caracteriza por la aparición de áreas no pigmentadas en la piel debido a la ausencia de melanocitos; generalmente, se hereda como un carácter autosómico dominante.

pilus (plural, **pili**) Canal de conjugación; apéndice hueco con forma de cabello de las células donantes de *E. coli* que actúa en la conjugación como puente para la transferencia de DNA a la célula receptora.

pirimidina Tipo de base nitrogenada; las bases pirimidínicas del DNA son la citosina y la timina.

placa de Petri Caja de fondo plano utilizada para el cultivo de microorganismos.

planta dioica Especie vegetal en la que los órganos masculinos y femeninos aparecen en individuos distintos.

planta monoica Especie vegetal en la que los órganos masculinos y femeninos aparecen en la misma planta, aunque en flores distintas.

plásmido Molécula extracromosómica de DNA con capacidad de replicación autónoma.

plásmido de 2 µm Molécula de DNA circular extragenómico con una circunferencia de 2 µm que se presenta de forma natural en algunas células de levadura. Se ha manipulado con técnicas de ingeniería genética para servir como base de varios tipos de vectores de clonación en levaduras.

plásmido R Plásmido que contiene uno o varios transposones que llevan genes de resistencia.

plásmido Ti Plásmido circular de *Agrobacterium tumefaciens* que permite a la bacteria infectar células vegetales y producir tumores (agalla en corona).

poder de resolución Capacidad de una técnica experimental para distinguir entre dos condiciones genéticas (en discusión normalmente cuando una de las condiciones es rara y de particular interés).

ploidía Número de dotaciones cromosómicas.

poky Mutante mitocondrial de *Neurospora* de crecimiento lento.

polaridad embrionaria (o de tejido) Generación de ejes de asimetría en un embrión en desarrollo o en un primordio tisular.

poliacrilamida Material utilizado para hacer geles electroforéticos para la separación de macromoléculas.

polidactilia Más de cinco dedos en las manos, los pies o en ambos. Se hereda de forma autosómica dominante.

poligenes *Véase* **hipótesis de los factores múltiples**.

polimerasa de DNA Enzima que sintetiza nuevas cadenas de DNA empleando un molde de DNA; existen varios tipos de esta enzima.

polimerasa de RNA Enzima que cataliza la síntesis de una cadena de RNA empleando un DNA como molde. En los eucariotas, hay varias clases de polimerasas de RNA. Los genes que determinan proteínas se transcriben con la polimerasa de RNA II.

polimorfismo Presencia en una población (o entre poblaciones) de varias formas fenotípicas asociadas a distintos alelos de un gen o a distintos homólogos de un cromosoma.

polimorfismo balanceado Polimorfismo genético estable que se mantiene por selección natural.

polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción *Véase* **RFLP**.

polipéptido Cadena de aminoácidos enlazados; una proteína.

poliploide Célula con tres o más dotaciones cromosómicas u organismo compuesto de tales células.

polisacárido Polímero biológico compuesto por subunidades de azúcares —por ejemplo, el almidón o la celulosa—.

polylinker *Véase* **sitio de clonación múltiple.**

portador Individuo que lleva un alelo mutante pero no lo expresa fenotípicamente, debido a la presencia de un alelo compañero dominante. Así, un individuo de genotipo *A a* se considera portador de *a* si hay dominancia completa de *A* sobre *a*.

primasa Enzima que sintetiza los cebadores de RNA durante la replicación del DNA.

primera ley de Mendel Los dos miembros de un par génico se separan uno del otro durante la meiosis; cada gameto tiene la misma probabilidad de recibir uno u otro miembro del par génico.

prión Partícula proteica infecciosa que produce enfermedades degenerativas del sistema nervioso central, como el «*scrapie*» de las ovejas y la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob en la especie humana.

Pro Prolina (aminoácido).

procariota Organismo compuesto por una célula procariótica, como las bacterias y las algas verde azuladas.

procesamiento alternativo de intrones Proceso mediante el cual se producen diferentes mRNA a partir del mismo transcrito primario, lo que ocurre gracias a variaciones en el patrón de eliminación de los intrones del transcrito. Se pueden producir múltiples «isoformas» de mRNA en una única célula o las distintas isoformas pueden mostrar patrones de expresión específicos de tejido. Si los exones alternativos se localizan dentro de la secuencia de lectura abierta del gen, los mRNA alternativos producirán proteínas diferentes.

producto de la meiosis Una de las (normalmente cuatro) células generadas tras las dos divisiones meióticas.

profago «Cromosoma» de fago integrado como parte de la estructura lineal del DNA cromosómico de una bacteria.

profase Fase temprana de la división nuclear en la que los cromosomas se condensan y se hacen visibles.

proflavina Mutágeno que suele producir mutaciones de cambio de fase.

progreso de selección Diferencia entre la media de una población y la media de los descendientes de la siguiente generación nacidos de progenitores seleccionados.

promotor Región reguladora situada a corta distancia del extremo 5' de un gen, que actúa como sitio de unión de la polimerasa de RNA.

proporción (razón) mendeliana Razón matemática entre los fenotipos de los descendientes que se produce como consecuencia de la aplicación de las leyes de Mendel.

proporción (razón) no mendeliana Razón matemática inusual entre los fenotipos de los descendientes que no se explica con la aplicación simple de las leyes de Mendel; por ejemplo, proporciones mutantes:silvestres de tipo 3:5, 5:3, 6:2 ó 2:6 en las tétradas indican que se ha producido conversión génica.

propositus En un pedigrí humano, la persona que llamó por primera vez la atención del genetista.

proteína activadora de los genes catabólicos *Véase* **CAP**.

proteína adaptadora Proteína que se une a ciertas secuencias específicas fosforiladas de una segunda proteína, con frecuencia un receptor transmembrana, y que se asocia además a otras proteínas, lo que provoca el ensamblaje de un complejo de proteínas al receptor. Esto aproxima las proteínas del complejo entre sí y permite la propagación de una señal intracelular a través de una cadena de transducción de dicha señal.

proteína G Miembro de una familia de proteínas que participan en la transducción de señales mediante interacciones proteína-proteína que se producen cuando la proteína G está unida a GTP, pero no cuando lo está a GDP.

proteína motora Proteína capaz de moverse unidireccionalmente a lo largo de un tipo concreto de fibra del citoesqueleto. Las quinesinas y las dineínas son proteínas motoras de los microtúbulos, y las miosinas son proteínas motoras de los microfilamentos. Mediante su unión a otros componentes celulares, las proteínas motoras pueden dirigir el movimiento de esos componentes dentro de la célula.

proteína represora Molécula que se une al operador, impidiendo así la transcripción de un operón.

proteínas hélice-lazo-hélice (HLH) Proteínas con una región que consta de dos hélices α separadas por un lazo (el dominio HLH); esta región de la proteína actúa como un dominio de unión a DNA específico de secuencia. Se piensa que estas proteínas son factores de transcripción.

proteínas HLH *Véase* **proteínas hélice-lazo-hélice**.

proteoma Conjunto completo de los genes de un genoma que determinan proteína.

protooncogén Versión celular normal de un gen que puede mutar para convertirse en un oncogén dominante.

protoplasto Célula vegetal a la que se le ha eliminado la pared celular.

protótrofo Estirpe de un organismo capaz de crecer sobre medio mínimo (*compárese* con **auxótrofo**).

provirus «Cromosoma» de virus integrado en el DNA de la célula hospedadora.

prueba *cis-trans* Prueba para determinar si dos mutaciones afectan a la misma unidad funcional o gen.

prueba de complementación *Véase* **prueba *cis-trans***.

prueba de la fluctuación Prueba empleada en microbios para establecer la naturaleza aleatoria de la mutación o para medir tasas de mutación.

prueba de chi cuadrado (χ^2) Prueba estadística utilizada para determinar la probabilidad de que, con las condiciones impuestas por una hipótesis propuesta, los resultados observados se hayan obtenido por azar.

prueba del heterocarionte Prueba para detectar mutaciones citoplásmicas basada en la aparición de asociaciones nuevas de fenotipos en células derivadas de heterocariontes especialmente marcados.

prueba específica de locus Sistema para la detección de mutaciones recesivas en diploides. Individuos normales tratados con un mutágeno se cruzan con individuos de prueba homocigóticos para los alelos recesivos de varios loci concretos; a continuación, se analiza la descendencia para detectar los fenotipos recesivos.

pseudodominancia Aparición repentina de un fenotipo recesivo en un pedigrí, debida a la deleción del alelo dominante que lo enmascaraba.

pseudogén Gen inactivo que deriva de un gen ancestral activo.

puente de hidrógeno Enlace débil que se establece cuando un átomo comparte un electrón con un átomo de hidrógeno; los puentes de hidrógeno son importantes en la especificidad del emparejamiento de las bases en los ácidos nucleicos y en la determinación de la forma tridimensional de las proteínas.

puff (engrosamiento cromosómico) *Véase* **puff cromosómico**.

puff cromosómico Engrosamiento en un sitio a lo largo de un cromosoma politénico; se trata de un sitio de transcripción activa.

punto caliente Zona de un gen con elevada tendencia a convertirse en sitio mutante, ya sea de forma espontánea o bajo la acción de un mutágeno particular.

punto de ruptura fijo Según el modelo del heterodúplice para la recombinación del DNA, punto a partir del cual comienza el desenrollamiento de la doble hélice, como preludio de la formación del DNA heterodúplice.

puntos de control Momentos particulares del ciclo celular en los que ciertos procesos de dicho ciclo, tal como la replicación cromosómica, han debido completarse con éxito para que el ciclo celular progrese hacia la etapa siguiente.

purina Tipo de base nitrogenada; las bases púricas del DNA son la adenina y la guanina.

QTL (del inglés, *Quantitative Trait Loci*) *Véase* **locus de un carácter cuantitativo**.

quiasma Estructura cruciforme que se observa con frecuencia entre las cromátidas no hermanas durante la meiosis; sitios donde se produce el entrecruzamiento.

quimera *Véase* **mosaico**.

quinasa de proteínas Enzima que fosforila residuos aminoacídicos de proteínas dianas concretas. Una de las clases principales de quinasas de proteínas fosforila tirosinas en las proteínas dianas, y la otra serinas y treoninas.

quinasa de proteínas dependiente de ciclina Familia de quinasas de proteínas que, una vez activadas por ciclinas y un elaborado conjunto de proteínas reguladoras positivas y negativas, fosforilan a ciertos factores de transcripción cuya actividad se precisa en una fase concreta del ciclo celular.

rango de hospedadores Conjunto de estirpes de determinada bacteria a las que puede infectar una estirpe concreta de un fago.

RAPD (del inglés, *Random Amplified Polymorphic DNA*) DNA polimórfico amplificado al azar. Conjunto de fragmentos genómicos amplificados con un solo cebador de PCR; muestra cierta variación de unos individuos a otros; los heterocigotos +/− para algún fragmento individual pueden servir como marcadores en cartografía genética.

ratón tetraparental Ratón que se desarrolla de un embrión generado mediante la fusión experimental de dos blástulas distintas.

raza geográfica Población de una especie que ocupa un área geográfica distinta a la de otras poblaciones de la misma especie y difiere de éstas en sus frecuencias alélicas.

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Método que permite la amplificación de tramos concretos de DNA mediante la explotación de ciertas características de la replicación de DNA.

reasociación (renaturalización) Asociación espontánea de dos moléculas de DNA de cadena sencilla para reconstituir una hélice doble que había sido previamente desnaturalizada.

receptor *Véase* **interacción ligando-receptor**.

receptor quinasa de tirosina Receptor transmembrana cuyo dominio citoplásmico incluye una actividad enzimática del tipo quinasa de tirosina. En situaciones normales, la quinasa se activa sólo tras la unión al receptor del ligando apropiado.

receptor transmembrana Proteína que atraviesa la membrana plasmática de la célula, teniendo la capacidad de unir a un ligando en su porción extracelular y una actividad (como quinasa de proteína, por ejemplo) inducible con la unión del ligando en su porción intracelular.

receptores de hormonas esteroides Familia de proteínas relacionadas que actúan como factores de transcripción cuando se unen a una determinada hormona. No todos los miembros de esta familia se unen realmente a una hormona esteroide; el nombre deriva del primer miembro de la familia que se descubrió, que sí era un receptor de una hormona esteroide.

recón Región de un gen en cuyo interior no puede haber entrecruzamiento; actualmente, sabemos que se corresponde con un par de nucleótidos.

recombinación (1) En general, cualquier proceso que ocurre en una célula diploide, o parcialmente diploide, que genera nuevas combinaciones alélicas o cromosómicas, ausentes en dicha célula o en sus progenitores. (2) En la meiosis, el proceso que genera un producto haploide de la meiosis cuyo genotipo difiere de cualquiera de los dos genotipos haploides que formaron el diploide meiótico.

recombinación específica de sitio Recombinación entre dos secuencias concretas que no precisan ser homólogas; está mediada por sistemas específicos de recombinación.

recombinación intercromosómica Recombinación que se produce como resultado de la segregación independiente.

recombinación intracromosómica Recombinación que se produce como resultado de un entrecruzamiento entre dos genes.

recombinante Individuo o célula cuyo genotipo se ha producido mediante recombinación.

redundancia terminal En los fagos, hace referencia a una molécula de DNA lineal con extremos de cadena sencilla que son más largos de lo necesario para cerrar el DNA en un círculo.

reemplazamiento génico Inserción de un transgén diseñado con técnicas de ingeniería genética en lugar de un gen residente; a menudo, sucede mediante entrecruzamiento doble.

región constante Parte de las moléculas de los anticuerpos que es prácticamente idéntica a las regiones correspondientes de otros anticuerpos de diferentes especificidades.

región hipervariable Parte de la región variable que confiere la especificidad a un anticuerpo.

región intersticial Región del cromosoma situada entre el centrómero y un sitio de reorganización cromosómica.

región reguladora Región situada aguas arriba (5') de un gen a la que se unen varias proteínas que dan lugar a que la transcripción ocurra en el momento y lugar apropiados.

región variable La región de una molécula de inmunoglobulina que muestra numerosas diferencias de secuencia entre anticuerpos con especificidades distintas. Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas son las que se unen al antígeno.

regla de la suma La probabilidad de que ocurra uno u otro de dos sucesos mutuamente excluyentes es la suma de sus probabilidades individuales.

regla del producto La probabilidad de que dos hechos independientes ocurran simultáneamente es el producto de las probabilidades individuales.

regresión Término acuñado por Galton para expresar la tendencia de un carácter cuantitativo a acercarse en la descendencia al valor medio de la población más de lo que se acercaba la media de sus progenitores. Se debe a los efectos sobre el carácter de la dominancia, las interacciones génicas y los factores no genéticos.

reloj molecular Tasa constante de cambio en las secuencias de DNA o proteína, como consecuencia de la mutación al azar y la deriva genética de las variantes moleculares no seleccionadas.

reorganización cromosómica Mutación cromosómica en la que partes de los cromosomas dan lugar a nuevas yuxtaposiciones.

reorganización génica Proceso de cambios programados en la estructura del DNA de células somáticas que provoca cambios en el número de genes o en las propiedades estructurales y funcionales de un gen reorganizado.

reparación por escisión Reparación de una lesión del DNA mediante la eliminación del tramo dañado y su sustitución por un tramo normal.

reparación por recombinación Reparación de un daño en el DNA mediante un mecanismo similar a la recombinación, que utiliza las enzimas implicadas en este proceso.

reparación SOS Mecanismo, propenso a errores, que permite eliminar daños estructurales graves en el DNA, permitiendo que la replicación progrese a través de la lesión mediante una polimerización imprecisa.

replicación Síntesis de DNA.

replicación conservativa Modelo para la síntesis de DNA, invalidado experimentalmente, que propone que la mitad de las moléculas de DNA hijas están constituidas en ambas cadenas por nucleótidos polimerizados de nuevo.

replicación dispersiva Modelo para la síntesis de DNA, invalidado experimentalmente, según el cual las moléculas hijas de DNA se forman mediante la mezcla más o menos al azar de tramos parentales y tramos recién sintetizados.

replicación semiconservativa Modelo establecido para la replicación del DNA, en el que cada molécula de hélice doble está compuesta de una cadena parental y otra sintetizada de nuevo.

replicón Región cromosómica bajo la influencia de un locus adyacente de inicio de la replicación.

represión por el catabolito Inactivación de un operón producida por la presencia de grandes cantidades del metabolito que es el producto final del operón.

reversión sexual Síndrome, conocido en la especie humana y en los ratones, de los individuos con constitución cromosómica XX que se desarrollan como machos. Sabemos que la reversión sexual se debe, en algunos casos, a la translocación de la región determinante de testículos del cromosoma Y al extremo de uno de los cromosomas X de tales individuos.

retención del marcador Técnica empleada en levaduras para averiguar el grado de ligamiento entre dos mutaciones mitocondriales.

retinoblastoma Cáncer humano de retina que se manifiesta durante la niñez.

retrotranscriptasa *Véase* **transcriptasa inversa**.

retrotransposón Elemento genético transponible que utiliza la transcriptasa inversa para su transposición mediante un intermediario de RNA.

retrovirus Virus de RNA que se replica tras su conversión en DNA de cadena doble.

reversión Aparición de un alelo silvestre a partir de uno mutante.

RF *Véase* **frecuencia de recombinación**.

RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción. En algunas posiciones cromosómicas, una sonda detecta a veces diferencias en los tamaños o el número de los fragmentos de restricción (a menudo, como resultado de la presencia o ausencia de dianas de restricción), siendo esta situación un RFLP. Si un individuo es heterocigótico para esta diferencia cromosómica, la región implicada se puede utilizar como marcador en cartografía genética.

rho Factor proteico de *E. coli* que se requiere para el reconocimiento de ciertas señales terminadoras de la transcripción.

ribosoma Orgánulo complejo que cataliza la traducción del RNA mensa-ero en una secuencia de aminoácidos. Se compone de proteínas y rRNA.

ribozimas Moléculas de RNA con actividades catalíticas, por ejem-plo, el autoprocesamiento de las moléculas de RNA en *Tetrahymena*.

RNA (ácido ribonucleico) Ácido nucleico de una sola cadena similar al DNA, aunque con el azúcar ribosa en lugar de la desoxirribosa y, respecto a las bases nitrogenadas, uracilo en vez de timina.

RNA complementario (cRNA) RNA sintético producido mediante la transcripción de un molde específico de DNA de cadena sencilla.

RNA heterogéneo nuclear (HnRNA) Conjunto de los diversos RNA alojados en el núcleo, que incluye los precursores de las moléculas de mRNA y otros tipos de RNA.

RNA mensajero *Véase* **mRNA**.

RNA ribosómico *Véase* **rRNA**.

RNA transferente *Véase* **tRNA**.

rRNA (RNA ribosómico) Clase de moléculas de RNA, cifradas en el organizador nucleolar, que intervienen (aunque de forma mal compren-dida) en la estructura y función del ribosoma.

ruta de desarrollo Sucesión de operaciones moleculares que se pro-ducen en un grupo de células equivalentes para la asignación de distintos destinos de desarrollo entre esas células.

S (unidad Svedverg) Unidad de sedimentación que se utiliza normal-mente para describir entidades moleculares de distintos tamaños (puesto que la velocidad de sedimentación está relacionada con el tamaño).

SAR (del inglés, *Scaffold Attachment Regions*) Regiones de unión al armazón (esqueleto) interno del cromosoma. Posiciones a lo largo del DNA a las que se une el armazón central del cromosoma.

satélite Región terminal de un cromosoma separada del cuerpo princi-pal de éste por un estrechamiento.

SCE (del inglés, *Sister Chromatid Exchange*) *Véase* **intercambio en-tre cromátidas hermanas**.

sector Área de tejido cuyo fenotipo es manifiestamente distinto del fenotipo del tejido circundante.

sectores gemelos Pareja de sectores mutantes en un tejido silvestre, producidos por entrecruzamiento mitótico en un individuo de genotipo heterocigótico adecuado.

secuencia de lectura abierta *Véase* **ORF**.

secuencia de replicación autónoma (ARS) Segmento de una molécu-la de DNA necesario para la iniciación de su replicación; se trata, nor-malmente, de un sitio reconocido por las proteínas del sistema de repli-cación, que se unen a él.

secuencia interruptora Intrón; tramo situado dentro de un gen, cuya función es generalmente desconocida. Este tramo se transcribe, pero el producto de su transcripción se elimina del mRNA maduro y funcional.

secuencia líder En el extremo 5′ de un mRNA, la secuencia que no se traduce a proteína.

secuencia repetida invertida (IR) Secuencia que aparece en formas idénticas pero con orientaciones invertidas; por ejemplo, en ambos ex-tremos de un transposón.

secuencia señal Región N-terminal de una proteína secretada, necesa-ria para su transporte a través de la membrana celular.

sedimentación Desplazamiento de una molécula en solución debido a la fuerza de la gravedad y a la acción, opuesta a ésta, de la tendencia de la molécula a flotar.

segmentación Proceso mediante el cual se establece el número correc-to de segmentos durante el desarrollo de un animal segmentado.

segregación (1) Citológicamente, separación de estructuras homólo-gas. (2) Genéticamente, generación de los dos fenotipos correspondien-tes a los dos alelos de un gen, ya sea en individuos distintos (segregación meiótica) o en tejidos distintos (segregación mitótica).

segregación adyacente En una translocación recíproca, la migración de un cromosoma translocado y otro normal a cada uno de los polos de la célula.

segregación alternada En una translocación recíproca, la migración de los dos cromosomas normales a un polo de la célula y de los dos cromosomas translocados al otro polo.

segregación en la segunda división Disposición lineal en las ascospo-ras de los genotipos para dos alelos de un gen, que demuestra que ambos alelos se separan a núcleos distintos sólo tras la segunda división meióti-ca como resultado de un entrecruzamiento entre el gen y su centrómero; únicamente se puede detectar en ascas ordenadas.

segregación independiente *Véase* **segunda ley de Mendel**.

segunda ley de Mendel Ley de la segregación independiente: los ale-los de los genes no ligados o escasamente ligados (es decir, situados a gran distancia en el mismo par de cromsomas homólogos) segregan de forma independiente durante la meiosis.

selección dependiente de frecuencia Selección en la que la aptitud de los genotipos depende de sus frecuencias relativas dentro de la población.

selección direccional Selección que cambia la frecuencia de un alelo en una dirección constante, ya sea hacia su fijación o su eliminación.

selección familiar Método de mejora genética que consiste en selec-cionar a una pareja en base al rendimiento medio de su descendencia.

selección independiente de frecuencia Selección en la que las aptitu-des de los genotipos son independientes de sus frecuencias relativas en la población.

selección por filtración Técnica empleada con hongos filamentosos para aislar mutantes auxótrofos.

selección por truncamiento Técnica de mejora genética en la que se seleccionan como progenitores para la siguiente generación aquellos in-dividuos en los que la expresión cuantitativa de un fenotipo se sitúa por encima o por debajo de un cierto valor (punto de truncamiento).

sembrar en placa de Petri Extender células sobre la superficie de un medio sólido que, previamente, se ha vertido en una placa de Petri y se ha dejado solidificar.

semiesterilidad Fenotipo de los individuos heterocigóticos para cier-tos tipos de aberraciones cromosómicas; se caracteriza por la disminu-ción en el número de gametos viables y, por tanto, en una reducción de su fertilidad.

señalización paracrina Proceso mediante el que una molécula secre-tada se une a un receptor presente en la superficie o dentro de las células vecinas, induciendo así una ruta de transducción de señal en la célula receptora.

separación de flujo *Véase* **FACS**.

Ser Serina (aminoácido).

serie cromosómica *Véase* **dotación cromosómica**.

sexducción Transmisión sexual de genes del cromosoma de un donan-te de *E. coli* situados en el factor de fertilidad.

sexo heterogamético Sexo que posee cromosomas sexuales hetero-mórficos (por ejemplo, XY) y que produce, por tanto, dos tipos diferen-tes de gametos con respecto a los cromosomas sexuales.

sexo homogamético Sexo que posee cromosomas sexuales homólo-gos (por ejemplo, XX).

silvestre Genotipo o fenotipo que se encuentra en la naturaleza o que presenta la estirpe estándar de laboratorio de un organismos concreto.

sinapsis Apareamiento estrecho de los cromosomas homólogos durante la meiosis.

síndrome de Down Fenotipo anormal en la especie humana, que incluye retraso mental debido a una trisomía del cromosoma 21; es más frecuente entre los niños nacidos de mujeres de edad avanzada.

síndrome de feminización testicular Síndrome humano, producido por una mutación en el gen que determina un receptor de andrógenos, en el que los individuos XY se desarrollan fenotípicamente como hembras.

síndrome de Klinefelter Fenotipo anormal en los varones debido a la presencia de un cromosoma X adicional (XXY).

síndrome de Marfan Enfermedad del tejido conjuntivo en la especie humana. Se manifiesta en varios síntomas, que incluyen extremidades y dedos muy largos y defectos cardíacos; se hereda como un carácter autosómico dominante.

síndrome de Turner Fenotipo anormal humano producido por la presencia de un único cromosoma sexual X (XO).

síndrome del maullido (síndrome *cri du chat*) Condición letal durante la infancia producida por una deleción de parte de uno de los homólogos del cromosoma 5.

SINE (del inglés, *Short INterspersed Element*) Elemento intercalado corto. Tipo de DNA repetido, de pequeño tamaño, que se encuentra disperso por todo el genoma eucariótico.

sinténico Segmentos de DNA en los que los genes se disponen en idéntico orden en especies relacionadas entre sí.

sistema del doble híbrido Pareja de vectores de levadura empleados para detectar interacciones proteína-proteína. Cada vector lleva el gen de una de las proteínas en estudio; si las proteínas se unen físicamente, se transcribe un gen testigo.

sistema endocrino Conjunto de órganos que secretan hormonas al sistema circulatorio del organismo.

sistema inmunológico Células y tejidos animales encargados de reconocer y atacar a sustancias extrañas dentro del organismo.

sitio AP Sitio apurínico o apirimidínico producido por la pérdida de un residuo de purina o de pirimidina en el DNA.

sitio de clonación múltiple Secuencia de DNA de un vector que contiene múltiples puntos de corte únicos para distintas enzimas de restricción; resulta, por tanto, muy útil para insertar DNA foráneo.

sitio marcado por su secuencia Región de secuencia conocida, relativamente pequeña, perteneciente a un tramo genómico clonado, que puede utilizarse en un ordenador para alinear distintos tramos clonados en un conjunto de clones solapados (*contig*).

sitio mutante (sitio mutado) Área dañada o alterada dentro de un gen mutado.

somatostatina Hormona de crecimiento humana.

sonda Segmento de ácido nucleico que se utiliza para identificar moléculas concretas de ácido nucleico que contienen la secuencia complementaria, normalmente mediante autorradiografía.

Southern (técnica de) Transferencia de fragmentos de DNA separados electroforéticamente, desde un gel a una hoja de material absorbente. A continuación, se baña la hoja en una solución que contiene la sonda marcada, que se unirá al fragmento de interés.

SSLP (del inglés, *Short Sequence Length Polymorphism*) Polimorfismo en la longitud de secuencias cortas. Variación en el número de repeticiones de elementos repetidos de pequeño tamaño (los DNA minisatélite y microsatélite) en un locus particular de cromosomas homólogos distintos; los heterocigotos constituyen marcadores útiles para la cartografía genética.

subdominancia Relación fenotípica en la que la expresión fenotípica del heterocigoto es menor que la de cualquiera de los dos homocigotos.

superdominancia Relación fenotípica en la que la expresión fenotípica del heterocigoto es mayor que la de cualquiera de los dos homocigotos.

superficie adaptativa *Véase* **paisaje adaptativo.**

superinfección Infección con un fago de una célula que ya posee un profago.

supersupresor Mutación que puede suprimir varias mutaciones; un ejemplo típico es el de un supresor de mutaciones sin sentido.

supresor Segunda mutación que anula el efecto de una primera, restaurando el fenotipo silvestre.

supresor de ámbar Alelo mutante que determina un tRNA cuyo anticodón ha cambiado de tal forma que, durante la traducción, inserta un aminoácido frente a un codón ámbar.

supresor de entrecruzamiento Inversión (generalmente compleja) que imposibilita el emparejamiento de los cromosomas homólogos y su entrecruzamiento.

supresor sin sentido Mutación que produce un tRNA alterado que, durante la traducción, insertará un aminoácido en respuesta a un codón sin sentido.

sustitución de un par de nucleótidos Cambio, generalmente de carácter mutagénico, de un par de nucleótidos concreto por un par distinto.

sustitución no sinónima Sustitución por mutación de un aminoácido por otro de propiedades químicas distintas. *Véase también* **mutación de cambio de sentido**.

sustitución sinónima Cambios de nucleótidos en la región del gen que determina proteína que no alteran la secuencia de aminoácidos en ésta.

T (1) Timina o timidina. (2) *Véase* **tetratipo**.

T-DNA Parte del plásmido Ti que se inserta en el genoma de la planta hospedadora.

tambaleo Capacidad de ciertas bases en la tercera posición de un anticodón del tRNA para formar enlaces por puente de hidrógeno de varias formas distintas, permitiendo así el alineamiento del tRNA con varios codones posibles.

técnica de la perdigonada Clonación de un gran número de fragmentos de DNA distintos, como paso previo a la selección de un tipo de clon particular para estudiarlo en detalle.

telofase Fase tardía de la división nuclear en la que se forman los núcleos hijos.

telomerasa Enzima que añade unidades repetidas a los extremos de los cromosomas para impedir su acortamiento después de cada ciclo de replicación; para ello, utiliza como molde un RNA especial de pequeño tamaño.

telómero Punta o extremo de un cromosoma.

teratógeno Agente que interfiere con el desarrollo normal.

teoría cromosómica de la herencia Teoría unificadora que propone que, generalmente, los patrones hereditarios pueden explicarse asumiendo que los genes se localizan en lugares específicos de los cromosomas.

teoría de las cuentas de un collar Hipótesis, en la actualidad desacreditada, de que los genes se disponen sobre los cromosomas como las cuentas de un collar, indivisibles en unidades más pequeñas de mutación o recombinación.

terapia génica Corrección de un defecto genético en una célula mediante adición de nuevo DNA y su inserción en el genoma.

test de Ames Prueba ampliamente utilizada en la detección de sustancias posiblemente carcinogénicas, se basa en la inducción de mutaciones en la bacteria *Salmonella*.

tétrada (1) Cuatro cromátidas homólogas agrupadas en la profase y la metafase de la primera división meiótica. (2) Las cuatro células haploides que se producen en una meiosis.

tétrada desordenada Tétrada en la que los productos de la meiosis no se disponen en ningún orden particular.

tétrada ordenada Tétrada que se genera cuando las divisiones nucleares meióticas y posmeióticas se producen de tal manera, que los núcleos hermanos de cada división permanecen uno junto al otro (sin intercambiar sus posiciones).

tetraploide Célula que posee cuatro dotaciones cromosómicas; organismo compuesto de dichas células.

tetratipo (T) Tipo de tétrada que contiene cuatro genotipos distintos, dos parentales y dos recombinantes.

Thr Treonina (aminoácido).

timidina Nucleósido cuya base nitrogenada es la timina.

timina Base pirimidínica que empareja con la adenina.

tipos sexuales Equivalentes en los oganismos inferiores a los sexos de los organismos superiores; normalmente, los tipos sexuales difieren sólo fisiológicamente y no por su apariencia física.

topoisomerasa Enzima capaz de cortar y reconstituir el esqueleto de polinucleótidos del DNA, facilitando así que éste adopte una configuración más relajada.

totipotencia Capacidad de una célula para llevar a cabo todas las fases del desarrollo y producir así un organismo adulto normal.

traducción Producción, mediada por el ribosoma, de un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos deriva de la secuencia de codones de una molécula de mRNA.

tramo de inserción (IS) Segmento móvil de DNA bacteriano (de varios centenares de pares de nucleótidos de longitud) que puede inactivar al gen en el que se inserta.

tramo de lectura Secuencia de codones determinada por nucleótidos que se leen en grupos de tres a partir de un codón concreto de inicio de la traducción.

tramo de lectura abierta *Véase* **ORF.**

transcripción Síntesis de RNA utilizando un DNA como molde.

transcriptasa inversa Enzima que cataliza la síntesis de DNA utilizando un molde de RNA.

transducción Movimiento de genes desde una bacteria donante a una receptora con la utilización de un fago como vector.

transducción abortiva Fallo en la incorporación de un segmento de DNA transducido al cromosoma de la célula receptora.

transducción especializada (restringida) Situación en la que un fago particular transduce únicamente regiones concretas del cromosoma bacteriano.

transducción generalizada Capacidad de ciertos fagos para transducir cualquier gen del cromosoma bacteriano.

transfección Proceso mediante el que un DNA exógeno en disolución es introducido en células cultivadas.

transformación (1) Modificaciones dirigidas del genoma mediante la aplicación externa del DNA de una célula de distinto genotipo. (2) Conversión de células cultivadas normales de un eucariota superior en células similares a las cancerosas, con división incontrolada.

transgén Gen que ha sido modificado *in vitro*, empleando técnicas de ingeniería genética, e introducido de nuevo en el genoma mediante transformación de la línea germinal.

transición Tipo de sustitución de un par de nucleótidos en el que una purina reemplaza a otra purina o una pirimidina a otra pirimidina. Por ejemplo, GC → AT.

transición alostérica Cambio de una conformación a otra en una proteína.

translocación Nueva localización de un segmento cromosómico en una posición distinta del genoma.

translocación insercional Inserción de un fragmento de un cromosoma en otro cromosoma no homólogo.

translocación recíproca Translocación en la que parte de un cromosoma se intercambia con parte de otro cromosoma no homólogo.

transposición *Véase* **translocación.**

transposón Elemento de DNA transponible con secuencias terminales repetidas, que suele llevar los genes que determinan las funciones necesarias para la transposición.

transversión Tipo de sustitución de un par de nucleótidos en el que una purina reemplaza a una pirimidina o viceversa. Por ejemplo, GC → TA.

trifosfato de adenosina *Véase* **ATP.**

triplete Los tres pares de nucleótidos que componen un codón.

triploide Célula que tiene tres dotaciones cromosómicas, o el organismo compuesto de tales células.

trisómico Organismo diploide con una copia adicional de uno de los cromosomas, dando lugar a un número cromosómico $2n + 1$.

tritio Isótopo radiactivo del hidrógeno.

tRNA Clase de moléculas de RNA de pequeño tamaño que llevan aminoácidos específicos al ribosoma durante la traducción; el aminoácido se inserta en la cadena polipeptídica naciente cuando el anticodón del tRNA se empareja con el codón del mRNA que se está traduciendo.

tRNA isoaceptores Moléculas distintas de tRNA que cargan el mismo aminoácido.

Trp Triptófano (aminoácido).

tubo de conjugación *Véase* **pilus.**

Tyr Tirosina (aminoácido).

U Uracilo o uridina.

unidad de mapa (m.u.) «Distancia» entre dos genes ligados que determina que el 1 % de los productos meióticos sean recombinantes; una unidad de distancia en un mapa de ligamiento.

uracilo Base pirimidínica que aparece en el RNA en lugar de la timina del DNA.

URF (del inglés, *Unassigned Reading Frame*) Tramo de lectura abierta (ORF) cuya función todavía no se ha determinado.

uridina Nucleósido cuya base nitrogenada es el uracilo.

Val Valina (aminoácido).

valor de la variable Valor numérico concreto que adquiere una variable.

valor parental medio Media de los valores de un fenotipo cuantitativo en dos parentales concretos.

variable Propiedad que puede adquirir valores distintos en diferentes casos.

variación Diferencias entre los progenitores y su descendencia o entre los individuos de una población.

variación continua Variación que muestra una serie continua de valores fenotípicos.

variación cuantitativa Para un carácter concreto, existencia de un espectro amplio de fenotipos que se distinguen en el grado más que en diferencias cualitativas bien diferenciadas.

variación discontinua Variación de un determinado carácter en la que se observan clases fenotípicas bien diferenciadas.

variante Organismo individual que muestra diferencias observables con respecto al tipo considerado de modo arbitrario como estándar.

varianza Medida de la dispersión de una distribución alrededor de la clase central; media de los cuadrados de las desviaciones de la distintas observaciones con respecto al valor de la media.

varianza ambiental Varianza debida a variaciones ambientales.

varianza debida a la dominancia Varianza genética en un solo locus atribuible a la dominancia de un alelo sobre otro.

varianza genética Varianza fenotípica asociada a la existencia de genotipos diferentes dentro de la población.

varianza genética aditiva Varianza genética asociada al efecto medio de sustituir un alelo por otro.

variegación Aparición de sectores con fenotipos distintos en un tejido.

variegación por efecto de posición Variegación producida por la inactivación de un gen en algunas células, debido a su inclusión anormal en una región de heterocromatina.

vector En la clonación molecular, plásmido o cromosoma de un fago empleado como portador de un fragmento de DNA clonado.

vector de expresión Vector que posee una región bacteriana reguladora en *cis* que resulta apropiada para transcribir y traducir un gen foráneo en la bacteria.

vector transbordador Vector (por ejemplo, un plásmido) construido de tal forma que puede replicarse en al menos dos especies hospedadoras distintas, permitiendo el estudio y manipulación de un fragmento de DNA en varios entornos celulares.

viabilidad Probabilidad de que un huevo fertilizado sobreviva y se desarrolle en un individuo adulto.

virus tumoral Virus capaz de inducir un cáncer.

VNTR (del inglés; *Variable Number Tandem Repeat*) Número variable de repeticiones en tándem. Locus cromosómico en el que el número de repeticiones de una determinada secuencia difiere en individuos distintos o en los dos cromosomas homólogos de un individuo diploide.

Western Transferencia a una membrana de proteínas que se han separado electroforéticamente; la detección de una proteína concreta se realiza empleando un anticuerpo marcado.

X unido (*attached X*) Un par de cromosomas X de *Drosophila* unidos por sus extremos y que se heredan como una unidad.

yema Una de las célula hijas formadas en la mitosis de las levaduras; una célula hija mantiene la pared celular de la célula parental y la otra (la yema) sintetiza una pared celular nueva.

Respuestas a problemas seleccionados

Capítulo 1

3. Las propiedades del DNA que resultan fundamentales en su función de molécula responsable de la herencia son: su capacidad para replicarse; su contenido informativo, y su relativa estabilidad, a la vez que mantiene la posibilidad de cambiar o mutar. Las formas de vida extraterrestres podrían utilizar el RNA como material genético, como hacen ciertos virus. No obstante, entre los diversos tipos de moléculas que existen en la Tierra, sólo los ácidos nucleicos poseen las características necesarias.

4. 1 048 576.

6. Si el DNA es de cadena doble, G = C = 24 % y A = T = 26 %.

9. La cadena debe ser antiparalela a la cadena proporcionada, de manera que la secuencia sería:

3'-TAACCACGTAATGAAGTCCGAGA-5'

13. 3'-UUGGCACGUCGUAAU-5'

15. Azufre.

19. Tamaño del mRNA = tamaño del gen – (número de intrones × tamaño medio de los intrones).

20. 3'-AAU-5'.

25. La función de una proteína puede ser destruida por una mutación que provoca el cambio de un solo aminoácido, aunque la proteína mantenga las mismas propiedades inmunológicas. Por ejemplo, una enzima requiere la presencia de aminoácidos específicos en posiciones muy concretas de su centro activo. La sustitución de uno de esos aminoácidos claves podría no tener ningún efecto sobre el tamaño total y la forma de la proteína y, sin embargo, sí podría eliminar su función por completo.

27. **a.** Recesivo. El alelo silvestre proporciona enzima suficiente para un funcionamiento normal (la definición de haplosuficiente).

b. Existen muchas formas de que un gen mute y se elimine la función enzimática correspondiente. Una posible mutación sería un cambio de fase en un exón del gen. Si suponemos que se hubiera eliminado un solo par de bases, la mutación alteraría por completo el producto traducido a partir de ella, en dirección 3'.

c. Podría suministrarse hormona al paciente.

d. Si la hormona se requiere antes del nacimiento, la madre la estaría suministrando al feto.

31. La variación fenotípica dentro de una especie puede deberse al genotipo, a efectos ambientales y al azar (ruido aleatorio). La demostración de que la variación de un carácter tiene una base genética, especialmente los caracteres que muestran variación continua, requiere por tanto análisis controlados de forma muy cuidadosa.

Capítulo 2

3. La proporción en la descendencia es aproximadamente una 3:1, la esperada del cruzamiento clásico entre dos heterocigotos. Dado que negro (*B*) domina sobre blanco (*b*).

Progenitores: *B/b* × *B/b*
Descendencia: 3 negros : 1 blanco (1 *B/B* : 2 *B/b* : 1 *b/b*)

5. **(a)** $\frac{1}{216}$; **(b)** $\frac{1}{216}$; **(c)** $\frac{1}{216}$; **(d)** $\frac{125}{216}$; **(e)** $\frac{1}{72}$; **(f)** $\frac{1}{108}$; **(g)** $\frac{1}{36}$; **(h)** $\frac{5}{9}$.

7. **a.** (1) *p*(niña no perceptora) = $\frac{1}{8}$
(2) *p*(niña perceptora) = $\frac{3}{8}$
(3) *p*(niño varón perceptor) = $\frac{3}{8}$

b. *p*(dos primeros hijos perceptores) = $\frac{9}{16}$

10. $\frac{3}{4}$.

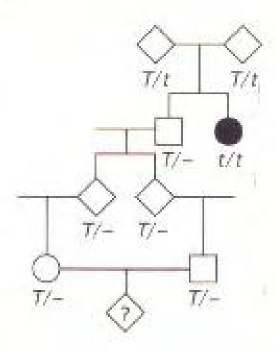
11. Las plantas son aproximadamente 3 con manchas : 1 sin manchas. Este resultado sugiere que «manchas en las hojas» domina sobre la «ausencia de manchas» y que la planta original autofecundada era un heterocigoto.

a. Llamemos *A* = manchas en las hojas y *a* = ausencia de manchas en las hojas.

P *A/a* (con manchas) × *A/a* (con manchas)
F_1 1 *A/A* : 2 *A/a* : 1 *a/a*
3 *A/*— (con manchas) : 1 *a/a* (sin manchas)

b. Todas las plantas sin manchas en las hojas deberían ser líneas puras en un cruzamiento de prueba con una planta sin manchas (*a/a*). Un tercio de las plantas con manchas en las hojas deberían ser líneas puras.

16. **a.** El pedigrí es:



b. $\frac{1}{144}$.

25. Llamemos *A* al alelo responsable de la acondroplasia y *a* al alelo normal; y *N* al alelo responsable de la neurofibromatosis y *n* al correspondiente alelo silvestre. Puesto que ambas condiciones son extremadamente raras, asumimos que las personas afectadas son heterocigotos. Suponemos que los dos genes segregan independientemente. El cruzamiento es:

P *A/a* ; *n/n* × *a/a* ; *N/n*
F_1 1 *A/a* ; *n/n* : 1 *a/a* ; *n/n* : 1 *a/a* ; *N/n* : 1 *A/a* ; *N/n*
1 acondroplasia : 1 normal : 1 neurofibromatosis : 1 acondroplasia y neurofibromatosis

27. **a.** y **b.** El cruzamiento 2 indica que púrpura (G) domina sobre verde (g) y el cruzamiento 1 que cortada (P) domina sobre patata (p).

Cruzamiento	Genotipos parentales	Descendencia
1	G/g ; $P/p \times g/g$; P/p	{3 cortada : 1 patata {1 púrpura : 1 verde
2	G/g ; $P/p \times G/g$; p/p	{3 púrpura : 1 verde {1 cortada : 1 patata
3	G/G ; $P/p \times g/g$; P/p	{ Todas púrpura {3 cortada : 1 patata
4	G/g ; $P/P \times g/g$; p/p	{ Todas cortada {1 púrpura : 1 verde
5	G/g ; $p/p \times g/g$; P/p	{1 cortada : 1 patata {1 púrpura : 1 verde

33. P $s^+/s^+ \times s/Y$

F_1 $\frac{1}{2}\ s^+/s$ hembra normal

$\frac{1}{2}\ s^+/Y$ macho normal

F_1 $s^+/s \times s^+/Y$

F_2 $\frac{1}{4}\ s^+/s^+$ hembra normal

$\frac{1}{4}\ s^+/s$ hembra normal

$\frac{1}{4}\ s^+/Y$ macho normal

$\frac{1}{4}\ s/Y$ macho de alas pequeñas

En el cruzamiento: P $s^+/s \times s/Y$

Descendencia $\frac{1}{4}\ s^+/s$ hembra normal

$\frac{1}{4}\ s/s$ hembra de alas pequeñas

$\frac{1}{4}\ s^+/Y$ macho normal

$\frac{1}{4}\ s/Y$ macho de alas pequeñas

36. **a.** y **b.** La enfermedad no parece ser autosómica, ya que el carácter se hereda de una forma específica del sexo.

c. No puede estar ligada al Y, dado que hay mujeres afectadas.

d. Sí. Si el padre tiene un cromosoma X con un alelo dominante responsable de un carácter estarán afectadas todas las hijas y ninguno de los hijos varones.

e. Probablemente no. Si la madre fuera una portadora, sería muy improbable que pasara el alelo responsable del carácter a todas sus hijas y que no lo hiciera a ninguno de sus hijos varones.

39. **(a)** $\frac{1}{6}$; **(b)** $\frac{1}{3}$; **(c)** cero.

43. Una cuarta parte del esperma será b ; d.

49. En función del fenotipo, la mujer parece tener dos líneas celulares diferentes de glóbulos rojos para la actividad G6PD. Si G = actividad enzimática normal, y g = actividad enzimática reducida y resistencia a la malaria, entonces la mujer parece tener células $G/-$ y células g/g. Esto puede explicarse por la inactivación del X en las células de la mujer. Suponga que su genotipo es G/g. En aproximadamente la mitad de sus células, se inactivará el cromosoma que contiene el alelo G, dejando únicamente el alelo g. Estas células serán resistentes al parásito de la malaria. En la otra mitad de las células, se inactivará el cromosoma X que contiene el alelo g. Estas células tendrán un alelo G funcional y serán susceptibles al parásito.

51. **a.** Observe que únicamente están afectados los varones y que éstos tenían progenitores no afectados. Para caracteres raros, esto es lo que se espera para una enfermedad recesiva ligada al X.

b. Las madres de todos los varones afectados deben ser heterocigóticas para el alelo responsable de la enfermedad. Además, las hijas de todos los hombres afectados deben ser heterocigóticas. Finalmente, la mujer I-2 debe ser heterocigótica, ya que de otra forma el varón I-1 debería padecer la enfermedad.

Capítulo 3

1. La función clave de la mitosis es generar dos células hijas genéticamente idénticas a la célula progenitora original.

2. Dos funciones claves de la meiosis son reducir a la mitad el contenido de DNA y dar lugar a nuevas combinaciones del contenido genético del organismo para generar diversidad genética entre la descendencia.

6. Todas las células hijas tienen idéntico fenotipo: A/a ; B/b.

9. Las medidas del contenido de DNA cuadrarían con las células siguientes:

0.7 células haploides (esporas o células del gametofito).

1.4 células diploides en G_1 o células haploides después de la fase S y antes de la división celular.

2.1 células triploides del endospermo.

2.8 células diploides después de la fase S y antes de la división celular.

4.2 células triploides después de la fase S y antes de la división celular.

10. Suponga que ambas plantas son esporofitos diploides, y cada uno de ellos es homocigótico para los alelos en estudio (r/r para el mutante rojo y b/b para el individuo marrón). Ambos pueden sufrir meiosis para generar esporas que se dividen mitóticamente para dar lugar a gametofitos adultos haploides. Si asumimos que los dos progenitores generan igual número de esporas, se obtendrá igual número de plantas r (rojas) que de plantas b (marrones).

14. La electroforesis de campo pulsante separa las moléculas de DNA por sus tamaños. Cuando se aísla cuidadosamente el DNA de *Neurospora* (que posee 7 cromosomas distintos), la aplicación de esta técnica produciría 7 bandas. De forma similar, el guisante posee 7 cromosomas diferentes y dará lugar a 7 bandas (los cromosomas homólogos migrarán conjuntamente, como una sola banda).

18. Puesto que la «mitad» heredada es aleatoria, la posibilidad de recibir exactamente la misma mitad es extraordinariamente pequeña. Si ignoramos la recombinación y centramos nuestra atención únicamente en qué cromosomas se heredan de un progenitor (por ejemplo, los que se heredan del padre o los que se heredan de la madre), hay $2^{23} = 8\ 388\ 608$ combinaciones posibles.

21. Recuerde, el endospermo se forma a partir de dos núcleos polares (que son genéticamente idénticos) y un núcleo espermático.

Hembra	Macho	Núcleos polares	Esperma	Endospermo
s/s	S/S	s y s	S	$S/s/s$
S/S	s/s	S y S	s	$S/S/s$
S/s	S/s	$\frac{1}{2}\ S$ y S	$\frac{1}{2}\ S$	$\frac{1}{4}\ S/S/S$
				$\frac{1}{4}\ S/S/s$
		$\frac{1}{2}\ s$ y s	$\frac{1}{2}\ s$	$\frac{1}{4}\ S/s/s$
				$\frac{1}{4}\ s/s/s$

28. (5) apareamiento cromosómico.

29. $\frac{1}{6}$.

32. (1) Imposible; (2) meiosis II; (3) meiosis II; (4) meiosis II; (5) mitosis; (6) imposible; (7) imposible; (8) imposible; (9) imposible; (10) meiosis I; (11) imposible; (12) imposible.

Capítulo 4

1. El cruzamiento es *A/O* × *A/B*. Los niños son:

Genotipo	Fenotipo
$\frac{1}{4}$ *A/A*	A
$\frac{1}{4}$ *A/B*	AB
$\frac{1}{4}$ *A/O*	A
$\frac{1}{4}$ *B/O*	B

5. **a.** Orden de la dominancia: *n* > *s* > *c* > *a*.
   b. 1 *n/n* negro 1 *n/c* negro
   1 *n/s* negro 1 *s/c* sepia.

7. El marido es el padre del niño 1; el amante es el padre del niño 2; cualquiera de los dos podría ser el padre del niño 3.

11. El primer cruzamiento era *A/a* × *a*/Y. La descendencia esperada es:

1 *A/a* hembras de cerdas cortas
1 *a/a* hembras de cerdas largas
1 *a*/Y machos de cerdas largas
1 *A*/Y machos no viables

13. P *A/A* ; *B/B* (disco) × *a/a* ; *b/b* (alargado)
F$_1$ *A/a* ; *B/b* disco
F$_2$ 9 *A/—* ; *B/—* disco
3 *a/a* ; *B/—* esférico
3 *A/—* ; *b/b* esférico
1 *a/a* ; *b/b* alargado

15. **a.** El fenotipo ensortijado corresponde al genotipo *A/a*. Las aves normales y lanudas son homocigóticas.
   b. Cruzamiento normal × lanudo.

18. **a.** La línea 1 es homocigótica para un alelo recesivo (*a*) que no produce pisatina, el alelo silvestre (*A*) sí da lugar a la producción de pisatina. La línea 2 es homocigótica para un alelo dominante (*B*) que bloquea la expresión de la pisatina producida por el primer gen, el correspondiente alelo silvestre (*b*) sí permite la expresión de la pisatina fabricada gracias al primer gen.

   b. Cruzamiento 1: P *a/a* ; *b/b* × *A/A* ; *b/b*
   F$_1$ *A/a* ; *b/b*
   F$_2$ 3 *A/—* ; *b/b*
   1 *a/a* ; *b/b*

   Cruzamiento 2: P *A/A* ; *B/B* × *A/A* ; *b/b*
   F$_1$ *A/A* ; *B/b*
   F$_2$ 3 *A/A* ; *B/—*
   1 *A/A* ; *b/b*

   Cruzamiento 3: P *a/a* ; *b/b* × *A/A* ; *B/B*
   F$_1$ *A/a* ; *B/b*
   F$_2$ 9 *A/—* ; *B/—* sin pisatina
   3 *A/—* ; *b/b* con pisatina
   3 *a/a* ; *B/—* sin pisatina
   1 *a/a* ; *b/b* sin pisatina

   c. La línea 1 es incapaz de fabricar pisatina, mientras que la línea 2 bloquea la expresión de pisatina.

19. Es posible producir descendencia de color negro a partir de dos progenitores albinos que sean líneas puras si el albinismo se debe a los alelos de dos genes diferentes. Si el cruzamiento fuera

A/A ; *b/b* × *a/a* ; *B/B*

todos los descendientes serían

A/a ; *B/b*

y tendrían fenotipo negro debido a la complementación.

23. **b.** [illegible]

26. **a.** P *A/A* (agutí) × *a/a* (no agutí)
   Gametos *A* y *a*
   F$_1$ *A/a* (agutí)
   Gametos *A* y *a*
   F$_2$ 1 *A/A* (agutí) : 2 *A/a* (agutí) : 1 *a/a* (no agutí)

   b. P *B/B* (silvestre) × *b/b* (canelo)
   Gametos *B* y *b*
   F$_1$ *B/b* (silvestre)
   Gametos *B* y *b*
   F$_2$ 1 *B/B* (silvestre) : 2 *B/b* (silvestre) : 1 *b/b* (canelo)

   c. P *A/A* ; *b/b* (canelo o agutí marrón) × *a/a* ; *B/B* (negro no agutí)
   Gametos *A* ; *b* y *a* ; *B*
   F$_1$ *A/a* ; *B/b* (silvestre o negro agutí)

   d. 9 *A/–* ; *B/–* negro agutí
   3 *a/a* ; *B/–* negro no agutí
   3 *A/–* ; *b/b* canelo
   1 *a/a* ; *b/b* chocolate

   e. P *A/A* ; *b/b* (canelo) × *a/a* ; *B/B* (negro no agutí)
   Gametos *A* ; *b* y *a* ; *B*
   F$_1$ *A/a* ; *B/b* (silvestre)
   Gametos *A* ; *B*, *A* ; *b*, *a* ; *B* y *a* ; *b*
   F$_2$ 9 *A/–* ; *B/–* silvestre
   1 *A/A* ; *B/B*
   2 *A/a* ; *B/B*
   2 *A/A* ; *B/b*
   4 *A/a* ; *B/b*
   3 *a/a* ; *B/–* negro no agutí
   1 *a/a* ; *B/B*
   2 *a/a* ; *B/b*
   3 *A/–* ; *b/b* canelo
   1 *A/A* ; *b/b*
   2 *A/a* ; *b/b*
   1 *a/a* ; *b/b* chocolate

   f. P *A/a* ; *B/b* × *A/A* ; *b/b* (silvestre) (canelo)
   F$_1$ 1 *A/A* ; *B/b* silvestre
   1 *A/a* ; *B/b* silvestre
   1 *A/A* ; *b/b* canelo
   1 *A/a* ; *b/b* canelo

   A/a ; *B/b* × *a/a* ; *B/B* (silvestre) (negro no agutí)
   1 *A/a* ; *B/B* silvestre
   1 *A/a* ; *B/b* silvestre
   1 *a/a* ; *B/B* negro no agutí
   1 *a/a* ; *B/b* negro no agutí

   g. P *A/a* ; *B/b* × *a/a* ; *b/b* (silvestre) (chocolate)
   F$_1$ 1 *A/a* ; *B/b* silvestre
   1 *A/a* ; *b/b* canelo
   1 *a/a* ; *B/b* negro no agutí
   1 *a/a* ; *b/b* chocolate

   h. Cruzamiento 1: El progenitor F$_1$ es *A/A* y el albino original debe ser *c/c* ; *A/A* ; *b/b*.
   Cruzamiento 2: El progenitor albino debe ser *c/c* ; *A/A* ; *B/B*.
   Cruzamiento 3: La F$_1$ debe ser *C/c* ; *A/a* ; *B/B* y el progenitor albino tiene que ser *c/c* ; *a/a* ; *B/B*.
   Cruzamiento 4: El progenitor albino debe ser *c/c* ; *a/a* ; *b/b*.

29. El cruzamiento es
P *A/A* ; *p/p* × *a/a* ; *P*/Y
F$_1$ *A/a* ; *P/p* hembras de ojos púrpura
A/a ; *p*/Y machos de ojos rojos

F_2	Hembras		Machos	
	$\frac{3}{8}$ *A*/– ; *P*/*p*	púrpura	$\frac{3}{8}$ *A*/– ; *P*/Y	púrpura
	$\frac{3}{8}$ *A*/– ; *p*/*p*	rojos	$\frac{3}{8}$ *A*/– ; *p*/Y	rojos
	$\frac{1}{8}$ *a*/*a* ; *P*/*p*	blancos	$\frac{1}{8}$ *a*/*a* ; *P*/Y	blancos
	$\frac{1}{8}$ *a*/*a* ; *p*/*p*	blancos	$\frac{1}{8}$ *a*/*a* ; *p*/Y	blancos

31. La semilla es *A*/*a* ; *C*/*C* ; *R*/*r*.

33. a. El cruzamiento es:

P *td* ; *su* (silvestre) × td^- ; su^- (silvestre)
F 1 *td* ; *su* silvestre
1 *td* ; su^- requiere triptófano
1 td^+ ; su^+ silvestre
1 td^+ ; *su* silvestre

b. 1 dependiente de triptófano : 3 no dependientes de triptófano.

37. Los pedigríes como el mostrado son bastante comunes. Indican la ausencia de penetrancia completa debida a epistasia o a efectos ambientales. El individuo A debe tener el alelo autosómico dominante.

39. a. Se trata de un cruzamiento dihíbrido, con un solo fenotipo coloreado en la F_2. La proporción de blancos y negros indica que el genotipo doble homocigótico recesivo no confiere el fenotipo coloreado. Más bien, la fórmula general para el color se puede representar como *X*/– ; *y*/*y*.

Determinamos que la línea 1 es *A*/*A* ; *B*/*B* y la línea 2 *a*/*a* ; *b*/*b*. La F_1 es *A*/*a* ; *B*/*b*. Supongamos que *A* bloquea el color en la línea 1 y que *b*/*b* lo bloquea en la línea 2. La F_1 será de color blanco por la presencia de *A*. Los individuos de la F_2 son:

9 *A*/– ; *B*/– blancos, debido a *A*
3 *A*/– ; *b*/*b* blancos, debido a *A*
3 *a*/*a* ; *B*/– rojos
1 *a*/*a* ; *b*/*b* blancos, debido a *b*/*b*

b. Cruzamiento 1: *A*/*A* ; *B*/*B* × *A*/*a* ; *B*/*b* → todos *A*/– ; *B*/– blancos
Cruzamiento 2: *a*/*a* ; *b*/*b* × *A*/*a* ; *B*/*b* → $\frac{1}{4}$ *A*/*a* ; *B*/*b* blancos
$\frac{1}{4}$ *A*/*a* ; *b*/*b* blancos
$\frac{1}{4}$ *a*/*a* ; *b*/*b* blancos
$\frac{1}{4}$ *a*/*a* ; *B*/*b* rojos

41. a.

Cruzamiento	Progenitores	Descendencia
1	$A^S/A^S \times A^D/A^D$	A^S/A^D
CONCLUSIÓN:	A^S domina sobre A^D	
2	$A^S/A^D \times A^S/A^D$	$3\ A^S/– : 1\ A^D/A^D$
CONCLUSIÓN:	Apoya la conclusión del cruzamiento 1	
3	$A^D/A^D \times A^{Sd}/A^D$	$1\ A^{Sd}/A^D : 1\ A^D/A^D$
CONCLUSIÓN:	A^{Sd} domina sobre A^D	
4	$A^S/A^S \times A^{Sd}/A^D$	$1\ A^{Sd}/A^S : 1\ A^D/A^S$
CONCLUSIÓN:	A^{Sd} domina sobre A^S	
5	$A^D/A^D \times A^{Sd}/A^S$	$1\ A^{Sd}/A^D : 1\ A^D/A^S$
CONCLUSIÓN:	Apoya la conclusión del heterocigoto «super-doble»	
6	$A^D/A^D \times A^S/A^D$	$1\ A^D/A^D : 1\ A^D/A^S$
CONCLUSIÓN:	Apoya la conclusión del heterocigoto «super-doble»	

b. Aunque este razonamiento explica todos los cruzamientos, no da cuenta ni de la esterilidad femenina ni del origen de la planta «super-doble» a partir de una variedad de flor doble.

Se podrían proponer diversos mecanismos genéticos para explicar el origen de la variedad «super-doble» a partir de una de flor doble. La mayoría de estos mecanismos se tratarán en capítulos posteriores y, por tanto, no se mencionarán aquí. Sin embargo, en este punto es posible asumir sin problemas que, cualquiera que sea el mecanismo, resulta lo suficientemente aberrante como para bloquear la formación adecuada de la estructura compleja de la flor femenina. A causa de la esterilidad femenina, no es posible observar ningún homocigoto «super-doble».

43. a. Un cruzamiento trihíbrido daría una proporción 63:1. Por lo tanto, en este cruzamiento hay tres loci *R* segregando.

b. P R_1/R_1 ; R_2/R_2 ; R_3/R_3 × r_1/r_1 ; r_2/r_2 ; r_3/r_3
F_1 R_1/r_1 ; R_2/r_2 ; R_3/r_3
F_2 27 $R_1/–$; $R_2/–$; $R_3/–$ rojo
9 $R_1/–$; $R_2/–$; r_3/r_3 rojo
9 $R_1/–$; r_2/r_2 ; $R_3/–$ rojo
9 r_1/r_1 ; $R_2/–$; $R_3/–$ rojo
3 $R_1/–$; r_2/r_2 ; r_3/r_3 rojo
3 r_1/r_1 ; $R_2/–$; r_3/r_3 rojo
3 r_1/r_1 ; r_2/r_2 ; $R_3/–$ rojo
1 r_1/r_1 ; r_2/r_2 ; r_3/r_3 blanco

c. (1) Para obtener un proporción 1:1, sólo uno de los genes puede ser heterocigótico. Un cruzamiento representativo sería R_1/r_1 ; r_2/r_2 ; r_3/r_3 × r_1/r_1 ; r_2/r_2 ; r_3/r_3.
(2) Para obtener una proporción 3 rojos: 1 blanco, debe haber dos alelos de genes distintos segregando. Un cruzamiento representativo sería R_1/r_1 ; R_2/r_2 ; r_3/r_3 × r_1/r_1 ; r_2/r_2 ; r_3/r_3.
(3) Para obtener una proporción 7 rojos : 1 blanco, debe haber tres alelos de genes distintos segregando. El cruzamiento sería R_1/r_1 ; R_2/r_2 ; R_3/r_3 × r_1/r_1 ; r_2/r_2 ; r_3/r_3.

d. La fórmula es $1 - (\frac{1}{2})^N$, donde *N* = número de loci que están segregando en los cruzamientos representativos del apartado c.

45. a. El gen que causa la esclerótica azul y los huesos frágiles es pleiotrópico y presenta expresividad variable.

b. El alelo es autosómico dominante.

c. El pedigrí muestra la existencia de penetrancia incompleta y expresividad variable. Los individuos II-4, II-14, III-2 y III-14 tienen descendientes con la enfermedad, aunque ellos mismos no la expresan. Por lo tanto, podemos deducir que 4 de los 20 individuos llevan el alelo responsable de la enfermedad y no la manifiestan. Esto indica un 80% de penetrancia. (La penetrancia podría ser significativamente menor, ya que muchos posibles portadores no tienen descendencia). El pedigrí también manifiesta la existencia de expresividad variable. De los 16 individuos que expresan fenotípicamente el alelo dominante, 9 no tienen huesos frágiles. Generalmente, la expresividad, en lugar de expresarla en porcentajes, se indica en términos de ninguna, variable y muy variable.

47. a. El gen está situado en el cromosoma X. Se trata de una serie alélica múltiple con ovalado > hoz > redondeado.

Llamemos W^O = ovalado, W^H = hoz, W^R = redondeado. Los tres cruzamientos son:

Cruzamiento 1: $W^H/W^H \times W^R/Y \rightarrow W^H/W^R : W^H/Y$
Cruzamiento 2: $W^R/W^R \times W^H/Y \rightarrow W^H/W^R : W^R/Y$
Cruzamiento 3: $W^H/W^H \times W^O/Y \rightarrow W^O/W^H : W^H/Y$

b. $W^O/W^H \times W^R/Y \rightarrow 1\ W^O/W^R : 1\ W^H/W^R : 1\ W^O/Y : 1\ W^H/Y$, o 1 hembra ovalado : 1 hembra hoz : 1 macho ovalado : 1 macho hoz.

49. a. Los individuos platino son *a*/*a* ; *B*/–, los diamante son *A*/– ; *b*/*b* y los silvestres *A*/– ; *B*/–.

Cruzamiento 1 P *A*/*A* ; *B*/*B* × *a*/*a* ; *B*/*B*
F_1 *A*/*a* ; *B*/*B*
F_2 3 *A*/– ; *B*/*B* : 1 *a*/*a* ; *B*/*B*
Cruzamiento 2 P *A*/*A* ; *B*/*B* × *A*/*A* ; *b*/*b*
F_1 *A*/*A* ; *B*/*b*
F_2 3 *A*/*A* ; *B*/– : 1 *A*/*A* ; *b*/*b*
Cruzamiento 3 P *a*/*a* ; *B*/*B* × *A*/*A* ; *b*/*b*
F_1 *A*/*a* ; *B*/*b*
F_2 9 *A*/– ; *B*/– silvestre
3 *A*/– ; *b*/*b* diamante
3 *a*/*a* ; *B*/– platino
1 *a*/*a* ; *b*/*b* zafiro

b.

Zafiro × Platino			Zafiro × Diamante	
P	*a/a* ; *b/b* × *a/a* ; *B/B*		*a/a* ; *b/b* × *A/A* ; *b/b*	
F_1	*a/a* ; *B/b*	platino	*A/a* ; *b/b*	diamante
F_2	3 *a/a* ; *B/–*	platino	3 *A/–* ; *b/b*	diamante
	1 *a/a* ; *b/b*	zafiro	1 *a/a* ; *b/b*	zafiro

51. **a.** Llamemos *E* al gen implicado y supongamos la existencia de los alelos siguientes:

E^1 = negro
E^2 = marrón
E^3 = sin ojos

Si asumimos también que, en función de los diversos cruzamientos, negro > marrón > sin ojos, los genotipos del pedigrí serán:

I E^1/E^2 — E^3/E^3 — E^2/E^2
II E^1/E^2 — E^1/E^3 E^2/E^3 — E^1/E^3 — E^1/E^3
III E^2/E^3 E^2/E^3 — E^1/E^3 E^3/E^3
IV E^3/E^3

Dos genes. Si suponemos que hay dos genes, la pregunta a resolver es si ambos son autosómicos o si uno de ellos podría estar ligado al X. El color parece ser autosómico. La presencia o ausencia de ojos podría estar ligada al X. Llamemos:

B = negro X^E = ojos normales
b = marrón X^e = sin ojos

El pedigrí sería

I *B/b* ; X^E/Y — *B/b* ; X^e/X^e — *b/b* ; X^E/Y
II *B/b* ; X^E/Y — *B/b* ; X^E/X^e *b/b* ; X^E/X^e — *–/b* ; X^e/Y — *B/–* ; X^E/X^e
III *B/b* ; X^E/X^e *b/b* ; X^E/X^e — *B/–* ; X^E/Y *–/–* ; X^e/X^e
IV *–/b* ; X^e/Y

Con esta interpretación del pedigrí, el individuo II-3 es *b/b* ; X^E/X^e.

Sin disponer de datos adicionales es imposible escoger de manera científica entre las dos explicaciones posibles. Una «regla» esencial en ciencia es que debe utilizarse la explicación más sencilla hasta que no se disponga de datos que conduzcan a su rechazo. En este caso, la explicación con un único gen es, en esencia, tan compleja como la explicación con dos genes, con una salvedad. Esta salvedad está en que el color de ojos es un carácter esencialmente diferente de la ausencia de ojos. Por lo tanto, es mejor suponer que hay dos genes implicados.

b. El genotipo del individuo II-3 es E^2/E^3.

Capítulo 5

1. El 45 % de la descendencia será *A B/a b*.

2. P *A d/A d* × *a D/a D*
F_1 *A d/a D*
F_2 1 *A d/A d*
2 *A d/a D*
1 *a D/a D*

4. Los dos genes están separados por una distancia de 33 unidades de mapa (m.u.).

5. Puesto que sólo se obtienen tipos parentales, los dos genes deben estar muy próximos uno del otro, lo que da lugar a que la recombinación sea rara.

8. (**a**) 4 %; (**b**) 4 %; (**c**) 46 %; (**d**) 8 %.

11. **a.** Los cuatro genes están ligados.

b. y **c.** El mapa es:

B — *A, D* — *C*
10 m.u. 30 m.u.

Los cromosomas parentales eran *B* (*A, d*) *c*/*b* (*a, D*) *C*, donde los paréntesis indican que se desconoce el orden de los genes *A* y *D*.

d. Interferencia = 0.5

12. **a.** Los machos deben ser heterocigóticos para ambos genes, y los dos deben estar estrechamente ligados: *M F*/*m f*.

b. *m f*/*m f*

c. El sexo está determinado por la contribución del macho. Los dos gametos parentales son *M F*, que determina planta masculina (*M F/m f*), y *m f*, que determina planta femenina (*m f/m f*). La recombinación ocasional produciría *M f*, que determina planta hermafrodita (*M f/m f*), y *m F*, que determina esterilidad completa (*m F/m f*).

d. Recombinación en el macho que da lugar a *M f*

e. Los hermafroditas son raros, ya que los genes están estrechamente ligados.

15. **a.** *a-b*: 100 % (91 + 9)/1001 = 10 m.u.
b-c: 100 % (171 + 9)/1001 = 18 m.u.

b. Coeficiente de coincidencia = 0.5.

17. *v-b*: 18.0 m.u.
b-lg: 28.0 m.u.
Coeficiente de coincidencia = 0.79.

20. 1. *b a c*
2. *b a c*
3. *b a c*
4. *a c b*
5. *a c b*

22. **a.** La hipótesis es que los genes no están ligados. Por lo tanto, se espera una proporción 1:1:1:1.

b. $\chi^2 = 0.76$.

c. Con 3 grados de libertad el valor de *p* está entre 0.50 y 0.90.

d. Se obtendrá una desviación de los valores predichos por efecto del azar entre el 50 y el 90 % de las veces.

e. Se acepta la hipótesis inicial.

f. Los dos genes segregan de forma independiente, ya que el valor de χ^2 fue insignificante. Los genotipos de todos los individuos son:

P	dp^+/dp^+ ; *e/e* × *dp/dp* ; e^+/e^+	
F_1	dp^+/dp ; e^+/e	
Individuo de prueba	*dp/dp* ; *e/e*	
Descendencia	largas ebony	dp^+/dp ; *e/e*
	largas gris	dp^+/dp ; e^+/e
	cortas gris	*dp/dp* ; e^+/e
	cortas ebony	*dp/dp* ; *e/e*

29. Llamemos *A* = resistencia a la estirpe 24, *a* = susceptibilidad a la estirpe 24, *B* = resistencia a la estirpe 22, *b* = susceptibilidad a la estirpe 22.

a. P *A/A* ; *b/b* (770B) × *a/a* ; *B/B* (Bombay)
F_1 *A/a* ; *B/b* × *A/a* ; *B/b*
F_2 184 *A/–* ; *B/–*
63 *A/–* ; *b/b*
58 *a/a* ; *B/–*
15 *a/a* ; *b/b*
320

b. Valores esperados:

180 *A/–* ; *B/–*
60 *A/–* ; *b/b*
60 *a/a* ; *B/–*
20 *a/a* ; *b/b*

$\chi^2 = 1.555$, no significativo, se acepta la hipótesis.

31. a. La esclerosis azul es una enfermedad autosómica dominante. La hemofilia es una enfermedad recesiva ligada al X.

b. Si los individuos del pedigrí se numeran desde la generación I a la IV, y los individuos de cada generación se numeran siguiendo el sentido de las agujas de un reloj, comenzando desde la parte de arriba a la derecha del pedigrí, sus genotipos son:

I: *b/b ; H/h, B/b ; H/Y*

II: *B/b ; H/Y, B/b ; H/Y, b/b ; H/Y, B/b ; H/h, b/b ; H/Y, B/b ; H/h, B/b ; H/h, B/b ; H/–, b/b ; H/–*

III: *b/b ; H/–, B/b ; H/–, B/b ; h/Y, b/b ; H/Y, B/b ; H/Y, B/b ; H/–, B/b ; H/Y, B/b ; h/Y, B/b ; H/–, b/b ; H/Y, B/b ; H/–, b/b ; H/Y, B/b ; H/–, B/b ; H/Y, B/b ; h/Y, b/b ; H/Y, b/b ; H/Y, b/b ; H/–, b/b ; H/Y, b/b ; H/Y, B/b ; H/–, B/b ; H/Y, B/b ; h/Y*

IV: *b/b ; H/–, B/b ; H/–, B/b ; H/–, b/b ; H/h, b/b ; H/h, b/b ; H/Y, b/b ; H/H, b/b ; H/Y, b/b ; H/h, b/b ; H/H, b/b ; H/H, b/b ; H/Y, b/b ; H/Y, b/b ; H/H, b/b ; H/Y, b/b ; H/Y, B/b ; H/Y, b/b ; H/Y, b/b ; H/–, b/b ; H/Y, b/b ; H/Y, b/b ; H/–, b/b ; H/H, b/b ; H/–, b/b ; H/–, b/b ; H/Y, b/b ; H/Y, b/b ; H/Y, b/b ; H/h, B/b ; H/h, B/b ; H/Y, b/b ; H/Y, B/b ; H/Y, b/b ; H/h*

c. No hay evidencia de ligamiento entre las dos enfermedades.

d. Los dos genes segregan de forma independiente.

e. Ningún individuo podría considerarse recombinante intracromosómico. Sin embargo, varios individuos muestran la existencia de recombinación intercromosómica: todos los individuos de la generación III que presentan ambas enfermedades.

34. a.



b. No hay interferencia.

36. **(a)** 0.0336; **(b)** 0.182.

44. a. A partir de los datos, se puede concluir que los genes para el color de la flor y la altura de la planta están ligados (en el mismo cromosoma). La posición del gen para el ancho de la hoja no se puede establecer con estos datos, ya que toda la descendencia expresa el rasgo dominante. En el parental alto y roja, los alelos para alto y blanca están en configuración *cis* (en el mismo cromosoma), al igual que los alelos para corto y roja. Por tanto, los descendientes altos y blancas o cortos y rojas representan los cromosomas parentales, y los altos y rojas o los cortos y blancas son recombinantes. Los dos genes están situados a una distancia de 100 % (21 + 19)/ total = 4 unidades de mapa.

Alto, Roja, Ancha × corto, blanca, estrecha

$$\frac{T\ r}{t\ R} \cdot \frac{W}{W} \times \frac{t\ r}{t\ r} \cdot \frac{w}{w}$$

b. La probabilidad de obtener descendencia corto, blanca, ancha = $p(t\ r)^2$ = $(4\%/2)^2 = 0.04$.

Capítulo 6

1. a. +, +, *al-2, al-2*, +, +, *al-2, al-2*
al-2, al-2, +, +, *al-2, al-2*, +, +

b. El valor de 8 % se puede utilizar para calcular la distancia entre el gen y su centrómero (4 m. u.).

3. a. $f(0) = e^{-2}2^0/0! = e^{-2} = 0.135$

b. $f(1) = e^{-2}2^1/1! = e^{-2}(2) = 0.27$

c. $f(2) = e^{-2}2^2/2! = e^{-2}(2) = 0.27$

6. a. 25.5 m.u.

b. $\chi^2 = 2.52$. Con tres grados de libertad la probabilidad es mayor de 10 % para la ausencia de ligamiento entre los genes. Por lo tanto, se puede aceptar la hipótesis de ausencia de ligamiento.

7. a. Los parentales eran:

$$ad^-\ nic^+ ;\ leu^+\ arg^- \times ad^+\ nic^- ;\ leu^-\ arg^-$$

b. El cultivo 16 se obtiene como resultado de un entrecruzamiento entre *ad* y *nic*. El cultivo recíproco no aparece debido a que la muestra es pequeña.

8. **(a)** 0.28; **(b)** 0.35; **(c)** 0.22; **(d)** 0.72.

9. **(a)** 0.704; **(b)** 0; **(c)** 0.176; **(d)** 0.012; **(e)** 0.096; **(f)** 0; **(g)** 0.012.

11. a.



b. La clase 6 puede obtenerse mediante un entrecruzamiento sencillo que implique a las cromátidas 2 y 3, entre cada gen y su centrómero.

13. Cruzamiento 1:



Cruzamiento 2:



Cruzamiento 3:



El primero de los dos diagramas es el que mejor se ajusta a la interpretación de los datos.

Cruzamiento 4:

a *b*
5 11

Cruzamiento 5: DP = DNP (y RF = 49 %); los genes no están ligados.

a-centrómero: 100 % $\frac{1}{2}$(22 + 8 + 10 + 20)/99 = 30.3 m.u.

b-centrómero: 100 % $\frac{1}{2}$(24 + 8 + 10 + 20)/99 = 31.3 m.u.

Estos valores se aproximan al límite teórico del 67 % para loci que muestran patrones de segregación MU_1 y deberían tratarse con precaución.

Cruzamiento 6:

a *b*
>50 4
o
b *a*
>50 4

Cruzamiento 7:

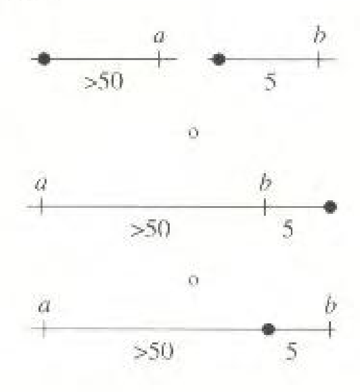
a *b*
1 1.5

Cruzamiento 8: Igual que el cruzamiento 5.

Cruzamiento 9:

a *b*
10.5 6.5

Cruzamiento 10:



Cruzamiento 11:



15. Cruzamiento 1: frecuencia de recombinación = 26.5 %
distancia de mapa sin corregir = 26.5 m.u.
distancia de mapa corregida = 34.5 m.u.
Cruzamiento 2: frecuencia de recombinación = 19 %
distancia de mapa sin corregir = 19 m.u.
distancia de mapa corregida = 29 m.u.
Cruzamiento 3 frecuencia de recombinación = 30 %
distancia de mapa sin corregir = 30 m.u.
distancia de mapa corregida = 40 m.u.

22. a. El mapa final es:

un — 12 m.u. — o — 19 m.u. — *cyh*
26.5

23. **(a)** 0 %; **(b)** 84 %; **(c)** 16 %; **(d-g)** 0 %.

27.

w — a c — b

Capítulo 7

1. Una estirpe Hfr tiene el factor de fertilidad, F, integrado en el cromosoma. Una estirpe F^+ tiene el factor de fertilidad en su forma libre, en el citoplasma. Una estirpe F^- carece de factor de fertilidad.

3. a. Durante la conjugación, las células Hfr transfieren los genes del donante de manera lineal. Los genes que se transfieren dependen tanto de la estirpe Hfr como del tiempo que dura de la transferencia. Por lo tanto, una población que contenga varias Hfr distintas mostrará una transferencia prácticamente aleatoria de los genes de las células hospedadoras. Este hecho es similar a lo que ocurre durante la transducción generalizada, en la que la cubierta proteica del virus se forma alrededor de un DNA de longitud determinada y no alrededor de genes concretos. En la transducción generalizada puede transferirse cualquier gen.

b. Los factores F' aparecen por la escisión imprecisa del factor de fertilidad en el cromosoma de una estirpe Hfr. Pueden tener sólo genes bacterianos concretos, ya que el sitio de integración es fijo para cada estirpe. La transducción especializada se parece a este hecho en que el DNA viral se integra en una región específica del cromosoma bacteriano y a continuación, tras una escisión imprecisa, únicamente puede llevarse con él genes bacterianos concretos. En ambos casos, lo que se transfiere es una segunda copia del gen.

6. MZXWC
WCNAL
ALBRU
BRUMZ

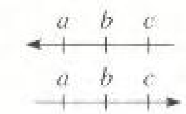
La región con las barras por encima o por debajo son idénticas en secuencia (y «cierran» el cromosoma circular). El orden correcto de los marcadores sobre este mapa circular es

–*M*–*Z*–*X*–*W*–*C*–*N*–*A*–*L*–*B*–*R*–*U*–

7. Una estirpe F^- responderá de manera diferente a una estirpe F^+ (L) o a una Hfr (M), mientras que Hfr × Hfr, Hfr × F^+, F^+ × F^+ y F^- × F^- no darán ningún recombinante. Por lo tanto, las estirpes 2, 3 y 7 son F^-. Las estirpes 1 y 8 son F^+, y las estirpes 4, 5 y 6 son Hfr.

10. a. El orden de los genes es *arg bio leu*.
b. *arg-bio*: RF = 12.76 m.u.
bio-leu: RF = 2.12 m.u.

11. La forma más directa sería poner una Hfr en ambos extremos de la misma secuencia y medir el tiempo de transferencia entre dos genes concretos. Por ejemplo:



13. La mejor explicación es que el marcador pro^+ integrado se incorporó en un factor F' que se transfirió tempranamente a las células receptoras durante el cruzamiento. Estas células llevan ahora el factor F y pueden transmitir el factor F', que aún lleva el marcador pro^+.

14. La elevada tasa de integración y la preferencia por el mismo sitio, ocupado originalmente por el factor sexual, sugiere que el F' tiene alguna homología con el sitio original. La fuente de esta homología podría ser un fragmento del factor sexual o, con mayor probabilidad, la copia cromosómica del gen bacteriano.

19. El número esperado de recombinantes dobles es 2. Interferencia = −1.5. Por definición, la interferencia es negativa.

22. En un porcentaje pequeño de los casos, los transductantes gal^- pueden aparecer por recombinación entre el DNA gal^+ del fago transductor *λdgal* y el alelo gal^- situado en el cromosoma. Esto generará transductantes gal^+ sin que se produzca la integración del fago.

23. a. Está implicado un proceso de transducción especializada. Se caracteriza por la transducción de uno o pocos marcadores.

b. El profago está situado en la región *cys-leu*, que es la única región que da lugar a colonias cuando se prueba con los seis nutrientes marcadores.

26. Tenga en cuenta que, si no se añade un compuesto y hay crecimiento, *E. coli* tiene que haber recibido los genes necesarios para ello por transducción. Por lo tanto, el cultivo BCE debe haber recibido a^+ y d^+. El cultivo BCD ha recibido a^+ y e^+; y el cultivo ABD los marcadores c^- y e^+. Así, el orden es *d a e c*. Observe que *b* nunca muestra cotransducción con los otros genes y está, por tanto, distante de este grupo de genes.

28. a. Todas las colonias son cys^+, y + o − para los otros dos genes.
b. (1) cys^+ leu^+ thr^+ y cys^+ leu^- thr^-
(2) cys^+ leu^+ thr^+ y cys^+ leu^- thr^+
(3) cys^+ leu^+ thr^+

c. Puesto que no hubo crecimiento en medio mínimo, ninguna colonia era leu^+ thr^+. Por lo tanto, las colonias del medio 1 eran cys^+ leu^- thr^-, las del medio 2 eran cys^+ leu^- thr^+. El resto de las colonias, un 39 %, fueron cys^+ leu^- thr^-.

d.

leu *cys* *thr*

Capítulo 8

1. El DNA de doble hélice presenta dos tipos de enlaces, covalentes y de hidrógeno. Los enlaces covalentes aparecen dentro de cada una de las cadenas lineales y unen fuertemente las bases, los azúcares y los grupos fosfato (tanto entre componentes del mismo tipo como entre componentes distintos). Los enlaces de hidrógeno se dan entre las dos cadenas, y se forman entre una base de una de las cadenas y una base de la otra cadena mediante apareamiento complementario. Estos enlaces de hidrógeno son individualmente débiles, aunque colectivamente son bastante fuertes.

3. Un cebador es un segmento corto de RNA que es sintetizado por la primasa, que utiliza el DNA como molde durante la replicación del DNA. Una vez se ha sintetizado el cebador, la polimerasa añade a continuación DNA al extremo 3' del RNA. Los cebadores son necesarios debido a que la polimerasa principal que cataliza la replicación del DNA es incapaz de iniciar la síntesis del DNA, y requiere un extremo 3'. El RNA es finalmente eliminado y reemplazado por DNA, de manera que no hay huecos en el producto final.

5. Puesto que la polimerasa de DNA puede añadir nuevos nucleótidos sólo al extremo 3' de una cadena de DNA y dado que las dos cadenas son antiparalelas, al menos son dos las moléculas de polimerasa de DNA que deben tomar parte en la replicación de cualquier región concreta de DNA. Cuando una región adopta una conformación de cadena sencilla, las dos cadenas tienen orientaciones opuestas. Imagine una región de cadena sencilla que curse de izquierda a derecha. En el extremo izquierdo, el extremo 3' de una de las cadenas apunta hacia la derecha, de manera que se puede iniciar la síntesis y continuar hasta el extremo derecho de la región. La otra cadena tiene un extremo 5' apuntando hacia la derecha, de forma que no puede iniciarse la síntesis ni continuar hacia el extremo derecho de la región de cadena sencilla a partir del extremo 5'. En lugar de esto, la síntesis debe iniciarse en algún sitio a la derecha del extremo izquierdo de la región de cadena sencilla y moverse hacia el extremo izquierdo de la región. Conforme la primera cadena continúa la síntesis (síntesis continua), la región de cadena sencilla se extiende hacia la derecha. Esto deja ahora la segunda cadena sin replicarse en esta nueva región de cadena sencilla, por lo que debe haber una segunda iniciación de la síntesis de DNA, que se mueve desde el extremo derecho actual de la región de cadena sencilla hacia el primer punto de iniciación en esta cadena. Esto da como resultado la síntesis discontinua a lo largo de la cadena.

7. El porcentaje tanto de A como de T es $\frac{1}{2}$ (52 %) = 26 %.

9. El resultado sugiere que el DNA se replica en segmentos cortos que son posteriormente unidos por una acción enzimática (ligasa de DNA). Puesto que la replicación del DNA es bidireccional, hay múltiples puntos a lo largo del DNA en los que se inicia la replicación y las polimerasas de DNA funcionan sólo en dirección 5' → 3', una de las cadenas de DNA está siempre en una orientación imposible para la función de la enzima. Esto requiere que la síntesis tenga lugar en fragmentos.

12. Las reglas de Chargaff determinan que A = T y G = C. Puesto que no se observa esta composición, la interpretación más probable es que se trata de DNA de cadena sencilla. El fago tendría que sintetizar primero una cadena complementaria antes de que pudiera comenzar a hacer múltiples copias de sí mismo.

13. Recuerde que hay dos enlaces de hidrógeno entre A y T mientras que hay tres enlaces de hidrógeno entre G y C. La desnaturalización requiere la rotura de estos enlaces, lo cual precisa energía. Cuantos más enlaces de hidrógeno haya que romper, mayor será la energía que habrá que aportar. Por tanto, la temperatura a la que una molécula dada de DNA se desnaturaliza depende de su composición de bases. Cuanto más elevada es la temperatura de desnaturalización, mayor es el porcentaje de pares G–C.

18. Los datos sugieren que cada cromosoma está compuesto de una molécula continua de DNA y que las translocaciones pueden variar sus tamaños. En c, parece que una parte del cromosoma más largo se ha translocado al cromosoma más corto.

Capítulo 9

1. La estructura primaria de una proteína es la secuencia de aminoácidos a lo largo de su longitud, que se mantiene mediante enlaces covalentes. La estructura secundaria de una proteína se debe a los enlaces de hidrógeno entre los grupos CO y NH de los distintos aminoácidos. Con frecuencia, se obtienen hélices α y láminas β plegadas. La estructura terciaria de una proteína está producida por fuerzas electrostáticas y enlaces de hidrógeno y de Van der Waals entre los grupos R de los aminoácidos. Si la proteína final y funcional se compone de más de un polipéptido, la proteína tiene entonces una estructura cuaternaria.

3. Un auxótrofo es una estirpe que requiere al menos un nutriente adicional a los que normalmente precisa el organismo.

5. Yanofsky analizó mutaciones en el gen *trpA* y las ordenó mediante análisis de transducción. Determinó también la secuencia de aminoácidos de los productos génicos alterados. Con esta estrategia, demostró la existencia de una correlación exacta entre la situación de los sitios mutados y la posición de los aminoácidos alterados.

7.

	B	K
rII	halos grandes	sin halos
rII$^+$	halos pequeños	con halos

9. La lactosa se compone de una molécula de galactosa y otra de glucosa. Se obtendría una cura secundaria si toda la galactosa y la lactosa fueran eliminadas de la dieta. Se esperaría que el alelo responsable de la enfermedad no fuera dominante, puesto que una copia correcta del gen debería permitir al menos alguna degradación de la galactosa, si no una degradación completa. De hecho, el alelo causante de la enfermedad es recesivo.

11. **a.** El uso principal está en la detección de los progenitores portadores y en el diagnóstico de una enfermedad en el feto.

b. Puesto que en el caso de la galactosemia solapan los valores de los individuos normales y de los portadores, hay ambigüedad en los casos de las personas que tienen de 25 a 30 unidades.

c. Estos alelos silvestres son fenotípicamente dominantes, aunque molecularmente dominan de forma incompleta. Un nivel mínimo de actividad enzimática es aparentemente suficiente para obtener la función y el fenotipo normales.

12. Una posibilidad menos probable es una mutación en la línea germinal. Más probable es que cada progenitor estuviera bloqueado en un punto diferente de una ruta metabólica. Si uno fuera *A/A·b/b* y el otro fuera *a/a·B/B*, el niño sería entonces *A/a · B/b* y tendría niveles suficientes de los dos enzimas resultantes como para producir pigmento.

14. **a.** La complementación hace referencia a genes dentro de una célula, que no es lo que está sucediendo en este caso. Probablemente, lo que está ocurriendo es lo que se conoce como alimentación cruzada, en la que un producto hecho por una estirpe difunde a otra estirpe y permite su crecimiento. La alimentación cruzada es equivalente al enriquecimiento del medio. Puesto que parece estar ocurriendo la alimentación cruzada, esto sugiere que las estirpes están bloqueadas en puntos diferentes de una ruta metabólica.

b. Para que tenga lugar la alimentación cruzada, la estirpe que toma la sustancia debe tener un bloqueo en un punto más cercano al comienzo de la ruta metabólica que el de la estirpe de la que obtiene el producto para el crecimiento.

c. *E–D–B*

d. Sin algo de triptófano no habría crecimiento en absoluto y las células no habrían sobrevivido el tiempo necesario para producir un producto que pudiera difundir.

18. **a.** 60 % de las meiosis no tendrán entrecruzamiento.

b. Hay 20 m.u. entre los dos genes.

c. 10 %.

d. $\longrightarrow$ B $\xrightarrow[val\text{-}1]{}$ A $\xrightarrow[val\text{-}2]{}$ valina

20. **a.** Blanco

b. Azul

c. Púrpura

d. P b/b ; $D/D \times B/B$; d/d
F B/b ; $D/d \times B/b$; D/d
F_2 9 $B/-$; $D/-$ púrpura
3 b/b ; $D/-$ blanco
3 $B/-$; d/d azul
1 b/b ; d/d blanco
o 9:3:4

21. Si las mutaciones afectan a cistrones diferentes, el tamaño de la explosión debería ser el mismo en las configuraciones *cis* y *trans*; si están en el mismo cistrón, el tamaño de la explosión en la configuración *trans* debería ser cero. Por lo tanto, si se asume que *rV* está en *A*, *rW* también está en *A*, y *rU*, *rX*, *rY* y *rZ* están en *B*.

28.

|—— 0.072 m.u. ——| (de *a* a *b*)

his —— *a* —— *c* —— *b* —— *nic*

0.031 m.u. (*a*–*c*) 0.023 m.u. (*c*–*b*)

29. **a.** El alelo s^n domina sobre el s^f, ya que en el heterocigoto sólo hay 40 unidades del factor de la cuadratura.

b. En este caso, el alelo funcional es el recesivo.

c. El alelo s^f puede convertirse en dominante con el tiempo mediante dos formas: (1) podría mutar levemente, de forma que produjera más de 50 unidades, o (2) pueden mutar otros genes modificadores de modo que incremente la producción de s^f.

Capítulo 10

1. Puesto que el RNA puede hibridar con las dos cadenas, éste debe haber sido transcrito a partir de ambas. Esto no significa, sin embargo, que las dos cadenas sean utilizadas como molde en cada uno de los genes. Lo esperado es que en un gen concreto se utilice sólo una de las cadenas, aunque los diferentes genes se transcriban en direcciones distintas a lo largo del DNA. La prueba más directa sería purificar un RNA concreto que cifre una proteína específica y, a continuación, hibridarlo con el genoma de lambda. Sólo una de las cadenas debería hibridar con el RNA purificado.

3. Un cambio de un solo nucleótido daría lugar a cambios en tres aminoácidos adyacentes de la proteína. Se esperaría que los cambios de un solo aminoácido y de dos aminoácidos adyacentes fueran mucho más raros que los cambios en tres aminoácidos. Esto es exactamente lo contrario de lo que se observa en las proteínas.

7. El codón ámbar es el UAG. La siguiente lista incluye los aminoácidos, y sus codones, que deberían haber seguido insertándose para continuar con la cadena silvestre.

glutamina	CAA, CAG*
lisina	AAA, AAG*
ácido glutámico	GAA, GAG*
tirosina	UAU*, UAC*
triptófano	UGG*
serina	AGU, AGC, UCU, UCC, UCA, UCG*

En cada caso, el codón con el asterisco precisa un solo cambio de base para convertirse en UAG.

8. **(a)** $\frac{1}{4}$; **(b)** $\frac{1}{4}$; **(c)** $\frac{1}{8}$; **(d)** $\frac{1}{4}$.

10. **a.** $(GAU)_x$ determina Asp (GAU), Met (AUG) y fin de la traducción (UGA). $(GUA)_x$ determina Val (GUA), Ser (AGU) y fin de la traducción (UAG). Una de las fases de lectura contiene un codón sin sentido.

b. Cada una de las tres pautas de lectura contiene un codón sin sentido.

11. Mutante 1: Hay una sustitución simple de Arg por Ser, que sugiere un cambio de nucleótido. Dos de los codones de Arg son AGA y AGG, y uno de los codones de Ser es el AGU. La U de la tercera posición en el codón de Ser podría haber sido sustituida por una A o una G.

Mutante 2: El codón de Trp (UGG) ha cambiado a un codón sin sentido (UGA o UAG).

Mutante 3: Han ocurrido dos mutaciones de cambio de fase.

5'-GCN CCN (–U) GGA GUG AAA AA(+U o C) UGU/C CAU/C-3'

Mutante 4: Ha tenido lugar una inversión, después de Trp y antes de Cys. La secuencia original del DNA era:

3'-CGN GGN ACC TCA CTT TTT ACA/G GTA/G 5'

Por lo tanto, la secuencia complementaria de RNA era:

5'-GCN CCN UGG AGU GAA AAA UGU/C CAU/C 3'

La secuencia invertida de DNA pasa a ser:

3'-CGN GGN ACC AAA AAG TGA ACA/G GTA/G-5'

Por lo tanto, la secuencia complementaria de RNA era:

5'-GCN CCN UGG UUU UUC ACU UGU/C CAU/C-3'

12.

a. Vieja: AA(A/G) (A)GU CCA UCA CUU AAU GCN GCN AA(A/G) ← Base delecionada

b. Nueva: AA(A/G) GUC CAU CAC UUA AU(G) GCN GCN AA(A/G) ← Base añadida

14. 3'-CGT ACC ACT GCA-5'
5'-GCA TGG TGA CGT-3'
5'-GCA UGG UGA CGU-3'
3'-CGU ACC ACU GCA-5'
NH_2-Ala-Trp stop Arg

16. f, d, j, e, c, i, b, h, a, g

17. Las células de las líneas celulares establecidas y cultivadas durante mucho tiempo no son perfectamente diploides. Por razones que desconocemos actualmente, la adaptación al cultivo provoca frecuentes cambios en el cariotipo y en la dosis génica. Ello puede conducir a la hemicigosis de algunos genes, permitiendo así la expresión de alelos recesivos que permanecían «escondidos».

Capítulo 11

2. Los mutantes O^c se deben a cambios en la secuencia del DNA del operador que impiden la unión del represor *lac*. Por lo tanto, el operón *lac* asociado al operador O^c no puede ser desconectado. Como un operador sólo controla los genes situados en la misma cadena de DNA, las mutaciones O^c son de efecto *cis* (en la misma cadena) y dominantes (no pueden desconectarse).

7. Los mutantes Z^- no polares no pueden convertir la lactosa en alolactosa y, por tanto, el operón no se induce nunca.

9. En el control negativo, el operón es desactivado por la acción de un mediador, que debe ser eliminado para que se produzca la transcripción. En el control positivo, el operón se activa por la acción de un mediador, que debe ser añadido o activado para que haya transcripción.

10. El gen *lacY* produce una permeasa que transporta la lactosa hacia el interior de la célula. Un mutante $lacY^-$ no puede transportar la lactosa al interior celular, de manera que no se inducirá la β-galactosidasa.

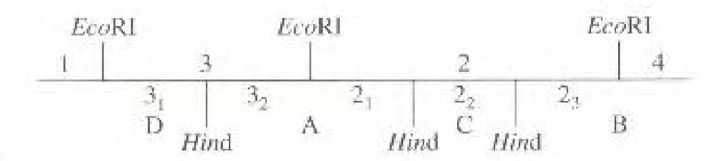
12. El operón bacteriano tiene una región promotora que se extiende aproximadamente 35 bases aguas arriba del lugar de inicio de la transcripción. Dentro de esta región está el promotor. Los inductores y los represores, que son proteínas que actúan en *trans* uniéndose a la región promotora, regulan únicamente la transcripción de los genes asociados en *cis*.

El gen eucariótico tiene la misma organización básica. Sin embargo, la región promotora es algo mayor. Además, existen intensificadores situados a varios miles de nucleótidos aguas arriba o aguas abajo que influyen en la tasa de transcripción. La diferencia principal es que no se ha demostrado la existencia de mensajeros policistrónicos en los eucariotas.

Capítulo 12

2. La secuencia GTTAAC aparece, como media, cada 4^6 bases (4.096 kb). La secuencia GGCC se da, como media, cada 4^4 bases (0.256 kb).

3.



5. Leída desde arriba, la secuencia es:
(*Eco*RI)–*Hind*II–*Hae*III–*Hae*III–*Hind*II–*Hae*III–*Hae*III–*Hae*III–*Hind*II–*Hin*-
d I I
–*Hae*III– *Hind*II–*Hae*II–extremo marcado

6. *Alu*I $(\frac{1}{2})^4$ = cada 256 pares de nucleótidos
*Eco*RI $(\frac{1}{4})^6$ = cada 4096 pares de nucleótidos
*Acy*I $(\frac{1}{4})^4(\frac{1}{2})^2$ = cada 1024 pares de nucleótidos

7. a.



b.



15. a. y b.

*Eco*RI 8.0 | 7.4 | 4.5 | 2.9 | 6.2
*Bam*HI 6.0 | 12.9 | 10.1
6.0 2.0 7.4 3.5 1.0 2.9 6.2
X

Capítulo 13

2. La electroforesis de campo pulsante consiste en el movimiento a través de un gel de segmentos de DNA del tamaño de un cromosoma. A menos que cambie el tamaño total del cromosoma, éste debe migrar siempre hasta la misma posición relativa.

a. Siete bandas idénticas a las del silvestre.

b. Siete bandas idénticas a las del silvestre.

c. Se espera que desaparezcan las bandas más grandes y las más pequeñas. Aparecerán dos nuevas bandas intermedias, a menos que migren en la misma posición que una de las otras cinco bandas silvestres.

d. Comparando con el silvestre, una banda sería más grande de lo esperado y otra más pequeña.

e. Siete bandas idénticas a las del silvestre.

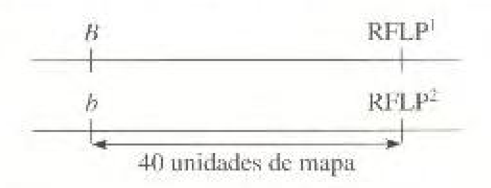
f. Siete bandas.

g. Desaparecería la banda más grande del silvestre y aparecería una banda aún mayor.

6. Una estrategia sería inactivar la función silvestre, mediante interrupción génica, y observar el fenotipo resultante. Para hacerlo, siga el protocolo de un solo paso descrito en la Figura 13-4. Inserte un gen de selección en el gen de interés clonado. Linearice el plásmido y utilícelo para transformar células de levadura, seleccionando el gen insertado en el de interés. Otra posibilidad es la mutagénesis dirigida.

7. Después de la electroforesis, utilice la técnica de Southern, empleando como sonda copias radiactivas del gen clonado.

9. a. El cruzamiento es *B*/*b* · RFLP¹/RFLP² × *b*/*b* · RFLP²/RFLP², donde *B* = cola curvada y *b* = silvestre, y RFLP¹ = fragmento *Hind*III de 1.7 kb y RFLP² = fragmento *Hind*III de 3.8 kb. Los datos sugieren que los dos marcadores están situados a una distancia de 40 m.u. (hay 40 % de recombinación).

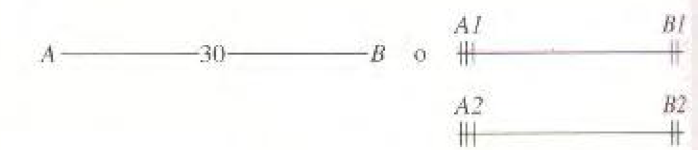


b. La descendencia silvestre debería ser

60 % «parental» *b* RFLP²/*b* RFLP²
40 % «recombinante» *b* RFLP¹/*b* RFLP²

10. a. 1: *A1*, *B2*, recombinante
2: *A2*, *B1*, recombinante
3: *A1*, *B1*, parental
4: *A2*, *B2*, parental

b.



12. a. Recuerde que los vectores plasmídicos pueden estar libres en el citoplasma, generándose múltiples copias que se distribuyen al azar entre las células hijas, o integrados en un cromosoma, en cuyo caso se replican con el cromosoma hospedador y se distribuyen como cualquier otro gen de la levadura durante la mitosis o la meiosis.

El 100 % de la descendencia producida por YP1 es *leu*⁺, lo que sugiere que el gen *leu*⁺ no se ha integrado en un cromosoma y que existen suficientes copias del plásmido para que todos los descendientes reciban al menos una copia.

YP2 produce un 50 % de descendientes *leu*⁻, lo cual indica una distribución ordenada y sugiere que el gen *leu*⁺ se ha integrado en un cromosoma de la levadura.

b. El «inserto», que no se corta con la enzima, es el gen *leu*⁺ presente en el plásmido.

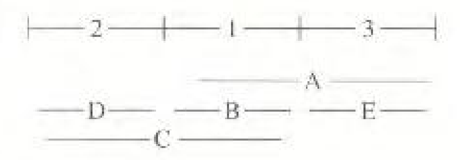
Tras la digestión, la electroforesis, la transferencia a membrana y la hibridación con la sonda, YP1 producirá una banda algo mayor que la del plásmido sin inserto (esto es, migra en la electroforesis a una distancia menor que el plásmido). YP2 dará lugar a dos bandas que contienen una parte del plásmido integrado más DNA genómico. Las posiciones de estas bandas, respecto del plásmido, no pueden predecirse.

Capítulo 14

1. a. La secuencia es 2 1 3 (6 3 1 2).

b. El YAC A incluye, al menos, parte de las regiones 1 y 3. El YAC B está contenido dentro de la región 1. El YAC C incluye, al menos, parte de las regiones 1 y 2. El YAC D está contenido dentro de la región 2. El YAC E está

ontenido dentro de la región 3. A continuación, se muestra un esquema de stos resultados. En éste, no es posible saber la posición exacta de los extremos de cada YAC.



3. El cruzamiento es

cys-1 RFLP-1^{O} RFLP-2^{O} × *cys-1*$^{+}$ RFLP-1^{M} RFLP-2^{M}

n descendiente de tipo parental tendrá el genotipo de una de las estirpes y stará en mayoría, mientras que uno de tipo recombinante será de genotipo nixto y aparecerá de forma minoritaria en las ascosporas. Claramente, los os primeros tipos de ascosporas son parentales y las demás recombinantes.

a. El locus *cys-1* está en esta región del cromosoma 5. De no ser así, o se habría observado ligamiento con ninguno de los loci RFLP.

b. La región completa tiene una longitud de 17 unidades de mapa.

```
|— 5 m.u. —|———— 12 m.u. ————|
RFLP-1    cys-1          RFLP-2
```

c. Se podrían emplear varias estrategias. Puesto que se trata de un nutante auxotrófico, se puede intentar la complementación funcional. La clonación posicional y el paseo cromosómico a partir de los RFLP son también strategias muy comunes.

5. Recuerde que un gen es una pequeña región de una larga cadena de DNA y que, en circunstancias normales, un gen clonado contendrá la secuencia completa de dicho gen. Si hay dos sitios de corte dentro del gen, se producirán tres fragmentos, todos los cuales hibridarán con la sonda, como se observó con la enzima 1. Cortes a ambos lados del gen producirán un solo ragmento que hibride con la sonda, como se observa con la enzima 2. Un olo sitio de corte dentro del gen producirá dos fragmentos que hibridarán on la sonda, como se observa con la enzima 3.

8. **a.** Los RAPD se generan por estar flanqueados por dos copias invertidas de la secuencia del cebador. En el esquema que se muestra, el cebador stá indicado con las X y la región amplificada aparece con corchetes. Por omodidad, las dos regiones amplificadas se han colocado sobre el mismo ramo de DNA de la estirpe 1.

```
            3'-XXX-5'                 3'-XXX-5'
5' ——— | ———————— | ———— [ ——————————— ] ——— 3'
3' ——— | ———————— | ———— [ ——————————— ] ——— 5'
     5'-XXX-3'            5'-XXX-3'
```

a estirpe 2 carece de una o dos regiones complementarias al cebador.

b. Los descendientes 1 y 6 son idénticos a la estirpe parental 1. Los lescendientes 4 y 7 son idénticos a la estirpe parental 2. Los descendientes 2 y 5 recibieron el cromosoma que contiene la banda superior de la estirpe parental 1 y el cromosoma de la estirpe parental 2 que contiene la región orrespondiente a la banda inferior (no apareciendo esta banda). Al descendiente 3 le ocurrió lo contrario: recibió el cromosoma que contiene la banda nferior de la estirpe 1 y el cromosoma de la estirpe parental 2 que contiene la egión correspondiente a la banda superior (no apareciendo esta banda). Por lo anto, las bandas 1 y 2 no están ligadas.

c. Recuerde que un ditipo no parental sólo tiene dos tipos, ambos recombinantes. Por lo tanto, la tétrada estaría compuesta por cuatro descendientes como los descendientes 2 y cuatro descendientes como los descendientes 3.

9. **a.** El gen *x* está situado en la región 5.

b. El gen *y* está situado en la región 8.

c. Ambas sondas hibridan con el cósmido E, ya que este cósmido es lo suficientemente grande como para contener los genes *x* e *y*.

11. **a.** Se obtuvo DNA de cada individuo. Se cortó con una enzima de restricción, se sometió a electroforesis, se transfirió a papel y se hibridó con las cinco sondas. Después de cada hibridación, se realizó un autorradiograma.

b. El locus RFLP más cercano al alelo de la enfermedad es el 4^{+}.

c. El marcador más cercano al gen es el RFLP4, que podría utilizarse para la clonación posicional del gen mediante paseo cromosómico. Sin embargo, con sólo cuatro descendientes, la distancia genética entre el gen y este marcador podría ser bastante grande. El número de marcadores para cada uno de los cromosomas humanos es, en estos momentos, bastante grande e incrementa casi diariamente. De ser posible, sería útil analizar esta familia con mayor detalle (y tantas otras familias para el carácter como fuera posible) para intentar localizar el gen con mayor precisión antes de proceder a la ardua tarea del «paseo».

Capítulo 15

1. El pétalo será ahora *W/w*, azul, ya sea completa o parcialmente, dependiendo del momento en el que se haya producido la reversión.

3. Siembre las células en un medio carente de prolina. Casi todas las colonias que aparezcan corresponderán a revertientes. El resto serán portadoras de una mutación supresora.

6. $1/10^{5}$ por división celular.

8. Tiña con iodina los granos de polen (haploides) de un parental homocigótico *Wx*. Obsérvelos al microscopio y busque los granos de polen de color rojo, indicativo de cambio por mutación a *wx*.

10. Un padre no puede pasar a su hijo el alelo responsable de una enfermedad ligada al X. Puesto que el alelo de la hemofilia debe proceder de la madre, la central nuclear no tiene responsabilidad alguna en el nacimiento del niño hemofílico. Sí entra dentro de lo posible que la exposición a la radiación sea la causante de una mutación que dé lugar a la aparición de un alelo responsable de la acondroplasia.

13. **a.** Completamente rojo.
   b. Completamente rojo.
   c. Muchas manchas rojizas pequeñas.
   d. Unas pocas manchas rojizas grandes.
   e. Como c, pero con menor número de manchas rojizas.
   f. Como d, pero con menor número de manchas rojizas.
   g. Algunas manchas grandes y muchas pequeñas.

16. Los mutantes se pueden clasificar de la siguiente manera:

Mutante 1: Mutante auxótrofo.
Mutante 2: Mutante no nutricional, sensible a la temperatura.
Mutante 3: Mutante auxótrofo rezumante.
Mutante 4: Mutante no nutricional, rezumante y sensible a la temperatura.
Mutante 5: Mutante auxótrofo, sensible a la temperatura.

18. **a.** Esta prueba permite identificar el número de genes distintos que pueden mutar para un fenotipo particular. En este problema, si la descendencia de un cruzamiento dado expresa todavía el fenotipo de movimiento anormal, las mutaciones no complementan y se consideran alelos del mismo gen; si la descendencia muestra fenotipo silvestre, las mutaciones complementan y las dos estirpes son portadoras de mutaciones en genes distintos.

b. A partir de los datos:

1 y 5	No complementan	gen A
2, 6, 8 y 10	No complementan	gen B
3 y 4	No complementan	gen C
7, 11 y 12	No complementan	gen D
9	Complementa con el resto	gen E

Existen cinco grupos de complementación (genes), identificados a partir de estos datos.

c. Mutante 1: $a^1/a^1 \cdot b^+/b^+ \cdot c^+/c^+ \cdot d^+/d^+ \cdot e^+/e^+$
Mutante 2: $a^+/a^+ \cdot b^2/b^2 \cdot c^+/c^+ \cdot d^+/d^+ \cdot e^+/e^+$
Mutante 5: $a^5/a^5 \cdot b^+/b^+ \cdot c^+/c^+ \cdot d^+/d^+ \cdot e^+/e^+$

híbridos $\frac{1}{2}$: $a^-/a^+ \cdot b^-/b^+ \cdot c^+/c^+ \cdot d^+/d^+ \cdot e^-/e^-$

fenotipo: silvestre

1 y 2 son mutantes de genes distintos

híbridos $\frac{1}{5}$: $a^-/a^- \cdot b^+/b^- \cdot c^-/c^- \cdot d^+/d^+ \cdot e^+/e^+$

fenotipo: movimiento a tirones bruscos

1 y 5 son mutantes del gen *A*

21. El cruzamiento es $arg^r \times arg^+$, siendo arg^r el revertiente. Sin embargo, otra posibilidad podría ser $arg^- \cdot su \times arg^+ \cdot su^-$, donde *su* (supresor) no tiene efecto sobre el gen *arg*.

a. Si se trata de una reversión precisa del cambio original que dio lugar al alelo mutante, el 100 % de los descendientes serán independientes de arginina.

b. Si la mutación supresora se produjo en un cromosoma distinto, el cruzamiento es arg^- ; $su \times arg^+$; su^+. La segregación independiente daría lugar a la siguiente descendencia:

1 arg^- ; su	independiente de arginina
1 arg^+ ; su^+	independiente de arginina
1 arg^- ; su^+	dependiente de arginina
1 arg^+ ; su	independiente de arginina

c. Si la mutación supresora se produjo a 10 unidades de mapa del locus *arg*, el cruzamiento es $arg^-\ su \times arg^+\ su^+$, y el diploide intermedio es $arg^-\ su/arg^+\ su^+$.

Los dos tipos parentales se darán en un 90 % y los dos recombinantes en un 10 %. La descendencia será:

45 % $arg^-\ su$	independiente de arginina
45 % $arg^+\ su^+$	independiente de arginina
5 % $arg^-\ su^+$	dependiente de arginina
5 % $arg^+\ su$	independiente de arginina

Capítulo 16

6. La despurinización consiste en la pérdida de una base adenina o guanina de un nucleótido. Como el sitio apurínico resultante no puede especificar la base complementaria, la replicación se bloquea. En ciertas condiciones, la replicación continúa después de la inserción al azar de una base cualquiera frente al sitio apurínico. En tres de cada cuatro ocasiones se producirá una mutación.

La desaminación de la citosina produce uracilo. Si el cambio no se repara, el uracilo emparejará con la adenina durante la replicación, produciéndose una mutación por transición.

El 8-OxodG puede emparejar con la adenina, produciendo una transversión.

7. El 5-bromouracilo es un análogo de la timina. Sufre cambios tautoméricos con una frecuencia mayor que lo hace la timina y, por tanto, es más probable que empareje con la guanina durante la replicación que en el caso de la timina. En la siguiente ronda de replicación, dará lugar a un par GC en lugar del par AT original.

El metanosulfonato de etilo es un agente alquilante que produce *O*-6-etilguanina. Esta guanina alquilada se empareja mal con la timina, por lo que se produce un cambio de GC a AT en la siguiente ronda de replicación.

10. La reparación de emparejamientos erróneos se produce cuando se inserta un nucleótido mal emparejado durante la replicación. La base nueva, incorrecta, se elimina, insertándose la correcta. Las enzimas que participan en este proceso pueden distinguir la cadena nueva de la vieja, ya que ésta está metilada en *E. coli*.

La reparación por recombinación se produce cuando lesiones como los sitios AP y los fotodímeros de luz UV bloquean la replicación (generándose un hueco en la cadena complementaria). La recombinación rellena este hueco con el tramo correspondiente de la molécula de DNA hermana, que es normal en sus dos cadenas. Esto da lugar a una molécula de DNA con un hueco frente a una cadena correcta, pudiéndose rellenar el hueco por complementariedad entre las bases, y a otra molécula con un fotodímero frente a una cadena correcta.

11. Los mutantes rezumantes producen un producto proteico alterado que retiene un bajo nivel de función. Por ejemplo, la actividad enzimática puede no eliminarse completamente por la mutación, sino verse reducida.

13. **a.** Como 5'-UAA-3' no contiene G o C, una transición en el DNA a un par GC nunca puede generar 5'-UAA-3'. A 5'-UGA-3' y 5'-UAG-3' les corresponden las secuencias de DNA antisentido 3'-ACT-5' y 3'-ATC-5', respectivamente. Una transición hacia cualquiera de esos dos codones de fin de mensaje puede ocurrir a partir de un triplete 3'-ATT-5' no mutante. Sin embargo, una secuencia de DNA 3'-ATT-5' determina la aparición en el RNA de UAA que, a su vez, es un codón de terminación de la traducción.

b. Sí. Un ejemplo sería el cambio de 5'-UGG-3', que determina Trp, a 5'-UAG-3'.

c. No. En los tres codones sin sentido, la única base sobre la que podría actuar sería la G (por ejemplo, en UAG). No obstante, la sustitución de una G por una A daría lugar a 5'-UAA-3', otro codón de terminación.

15. Para comprender estos resultados, debe recordar que la mitad de la descendencia tiene que provenir del progenitor silvestre.

a. La ausencia de revertientes sugiere la existencia de una deleción o una inversión dentro del gen.

b. *Protótrofo A:* Puesto que el 100 % de la descendencia es protótrofa, debe tratarse de una reversión verdadera de la mutación original.

Protótrofo B: La mitad de la descendencia es protótrofa como el parental. Los protótrofos restantes, el 28 %, corresponden a una nueva mutación. Observe que el 28 % es aproximadamente igual al 22 % de auxótrofos. Esto sugiere que se ha producido una mutación supresora no ligada a la mutación *nic* original, respecto de la cual segregaría independientemente.

Protótrofo C: Hay 496 protótrofos «revertientes» (los otros 500 son de tipo parental) y 4 auxótrofos. Este resultado sugiere que se produjo una mutación supresora en un sitio muy cercano [100 % (4 × 2)/1000 = 0.8 m.u.] al de la mutación original.

Capítulo 17

2. **(a)** 27 %; **(b)** 36 %.

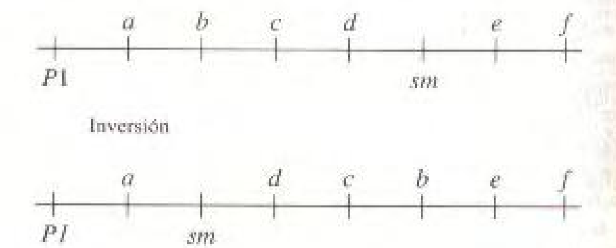
5. Ha ocurrido una deleción en el brazo izquierdo del cromosoma grande del núcleo 2, y se han perdido leu^-, el alelo *a* del tipo sexual y un^+.

8. El orden es *b a c e d f*.

Alelo	Banda
b	1
a	2
c	3
e	4
d	5
f	6

10. **a.** Se ha producido la inversión o la deleción de 18 unidades de mapa (m.u.). Una gran inversión daría lugar a semiesterilidad, mientras que una gran deleción sería probablemente letal. Por tanto, lo más probable es que se haya producido una inversión.

b. Normal



Alternativamente, *sm* podría estar situado en una posición externa con respecto al locus *e*, tanto en el cromosoma normal como en el de la inversión.

c. La semiesterilidad es el resultado del entrecruzamiento en la región invertida. Todos los productos del entrecruzamiento tendrían duplicaciones y deleciones.

13. La explicación más probable es que uno o ambos puntos de ruptura están situados en genes esenciales.

20. **a.** La inversión debe incluir desde *b* hasta *x*.

b. Cuando está implicada una inversión, la obtención de descendencia recombinante requiere un entrecruzamiento doble dentro de la región invertida o entrecruzamientos sencillos entre *f* y el punto de la inversión, localizado en una posición entre *f* e *y*.

22. **a.** y **b.** (**Nota:** DR = doble recombinante)

Clase 1:	parental
Clase 2:	parental
Clase 3:	DR *y-cv* y *B-car*
Clase 4:	recíproca de la clase 3
Clase 5:	DR *cv-v* y *v-f*
Clase 6:	recíproca de la clase 5
Clase 7:	DR *cv-v* y *f-car*
Clase 8:	recíproca de la clase 7
Clase 9:	DR *v-cv* y *v-f*
Clase 10:	recíproca de la clase 9
Clase 11:	Esta clase es idéntica al cromosoma X del macho parental y no ha podido generarse a partir de la hembra parental. Por tanto, procede de espermatozoides del macho. En *Drosophila*, el sexo está determinado por la relación entre el número de cromosomas X y el número de dotaciones autosómicas. En los machos, la relación es 1X:2A, donde A representa los autosomas procedentes de un progenitor (en las hembras, la relación es 2X:2A). Por lo tanto, esta clase de machos ha debido producirse por la fusión de un espermatozoide portador de un cromosoma X con un óvulo originado mediante no disyunción del X y que sólo lleva autosomas. Puesto que toda la descendencia no parental se debe a dobles entrecruzamientos, debe haber una inversión que cubre todos los genes en estudio.

c. Los individuos de la clase 11 deben ser portadores de un solo cromosoma sexual, lo cual puede corroborarse mediante análisis citológico.

32. **a.** El macho gris 1 se cruzó con una hembra amarilla, dando lugar a hembras amarillas y machos grises, que es lo contrario de lo esperado del ligamiento al sexo. Si el alelo e^+ estuviera translocado al cromosoma Y, el macho gris sería $X^eY^{e^+}$ (color gris). Si se cruzara con hembras amarillas, el resultado sería:

$X^eY^{e^+}$ machos grises $\quad$ X^eX^e hembras amarillas

b. El macho gris 2 se cruzó con una hembra amarilla, dando lugar a machos y hembras de colores gris y amarillo en iguales proporciones. Si el alelo e^+ estuviera translocado en un autosoma, la descendencia sería como se indica a continuación, donde «A» indica el autosoma implicado en la translocación y «/» separa las contribuciones de machos y hembras:

P	A^{e^+}/A ; X^e/Y × A/A ; X^e/X^e	
F_1	A^{e^+}/A ; X^e/X^e	hembras grises
	A^{e^+}/A ; X^e/Y	machos grises
	A/A ; X^e/X^e	hembras amarillas
	A/A ; X^e/Y	machos amarillos

38. El porcentaje de degeneración observado en la descendencia del macho anormal es aproximadamente un 50 % mayor que el observado en la descendencia de un macho normal. La semiesterilidad es una característica de los heterocigotos para las translocaciones. Esto podría verificarse mediante la observación citológica de las células meióticas del macho raro.

39. **Nota:** ES = entrecruzamiento sencillo

a. La heterocigosis para translocaciones recíprocas da lugar a duplicaciones y deleciones. Por lo tanto, en las ascas en las que se produce un entrecruzamiento dentro de la región translocada, cada hecho de entrecruzamiento generaría dos ascosporas blancas que abortarían y dos ascosporas oscuras viables. En ascas en las que no hubiera entrecruzamiento dentro de la región translocada, las ascosporas serían de color normal. Se supone segregación alternada.

Sin ES	ES
●	●
●	○
●	○
●	●

b. La heterocigosis para inversiones pericéntricas da lugar a duplicaciones y deleciones. Por lo tanto, en las ascas en las que se produce un entrecruzamiento dentro de la inversión pericéntrica, cada hecho de entrecruzamiento generaría dos ascosporas blancas que abortarían y dos ascosporas oscuras viables. En ascas en las que no hubiera entrecruzamiento dentro de la inversión pericéntrica, las ascosporas serían de color normal. Se supone segregación alternada.

Sin ES	ES
●	●
●	○
●	○
●	●

c. La heterocigosis para inversiones paracéntricas da lugar a un fragmento acéntrico que ha perdido material genético (deleción) y un cromosoma dicéntrico que ha ganado material genético (duplicación), siempre que se produzca un entrecruzamiento dentro de la inversión paracéntrica. Por lo tanto, en las ascas en las que se produce un entrecruzamiento dentro de la inversión paracéntrica, cada hecho de entrecruzamiento generaría dos ascosporas blancas que abortarían y dos ascosporas oscuras viables. En ascas en las que no hubiera entrecruzamiento dentro de la inversión paracéntrica, las ascosporas serían de color normal. Se supone segregación alternada.

Sin ES	ES
●	●
●	○
●	○
●	●

40. Probablemente, la especie B es la «parental». Un inversión paracéntrica en esta especie daría lugar a la especie D. La especie E podría aparecer entonces por una translocación de *z x y* a *k l m*. A continuación, la especie A podría ser el resultado de una translocación de *a b c* a *d e f*. Finalmente, la especie C podría aparecer por una inversión pericéntrica de *b c d e*.

Capítulo 18

1.

Síndrome de Klinefelter	varón XXY
Síndrome de Down	trisomía del cromosoma 21
Síndrome de Turner	hembra XO

3. **a.** 3, 3, 3, 3, 3/3, 3/3, 0, 0.

b. 7, 7, 7, 7, 8, 8, 6, 6.

5. b.

7. Si no se produce el apareamiento entre cromosomas procedentes del mismo progenitor, todas las parejas serán *A/a*. Los gametos serían 1 *A/A* : 2 *A/a* : 1 *a/a*. Tras la autofecundación, la descendencia será 1/16 *A/A/A/A*, 4/16 *A/A/A/a*, 6/16 *A/A/a/a*, 4/16 *A/a/a/a*, 1/16 *a/a/a/a*. Si no se produce el apareamiento entre cromosomas procedentes de progenitores distintos, todas las parejas serán *B/B* y *b/b*, de modo que todos los gametos serían *B/b*. Por tanto, el 100 % de la descendencia será *B/B/b/b*.

11. b, f y h, y en ocasiones c.

12. La ceguera a los colores es una enfermedad recesiva ligada al X. Esto significa que la mujer con el síndrome de Turner tuvo que recibir su único cromosoma X de la madre, y no recibió ningún cromosoma sexual de su

padre, lo cual indica que la no disyunción ocurrió en éste. La no disyunción pudo haber sucedido tanto en M_I como en M_{II}.

Si un paciente con ceguera a los colores padeciera el síndrome de Klinefelter (XXY), ambos cromosomas X deberían llevar el alelo responsable de la ceguera a los colores. Por lo tanto, la no disyunción tuvo que ocurrir en la madre. Recuerde que, si no hay entrecruzamiento entre el gen y el centrómero, los alelos se separan uno del otro durante la meiosis I. Durante la meiosis II, se separan los alelos idénticos situados en las cromátidas hermanas. Por lo tanto, al ser ambos alelos idénticos, la no disyunción debió producirse durante la meiosis II.

17. **a.** Pérdida de un cromosoma X en el feto en desarrollo después del estadio de dos células.

b. No disyunción que provoca síndrome de Klinefelter (XXY), seguida de un hecho de no disyunción del cromosoma Y en una célula después del estadio de dos células, dando lugar a células XX y XXYY.

c. No disyunción del cromosoma X en el estadio de una célula.

d. Fusión de cigotos XX y XY, o fecundación de un óvulo y de un cuerpo polar con un espermatozoide que lleva un cromosoma X y otro espermatozoide que lleva un cromosoma Y, seguido de fusión.

e. No disyunción del cromosoma X en el estadio de dos células o posteriormente.

19. **a.** El cromosoma extra debe provenir de la madre. Como los cromosomas son idénticos, la no disyunción debió haber ocurrido en M_{II}.

b. El cromosoma extra debe provenir de la madre. Como los cromosomas no son idénticos, la no disyunción debió haber ocurrido en M_I.

c. La madre aportó correctamente un cromosoma 4 pero el padre no lo aportó. Por lo tanto, la no disyunción ocurrió en el macho en cualquier división meiótica.

d. Una línea celular carece de cromosomas maternos, mientras que la otra contiene un número doble de cromosomas maternos. Como ambas líneas son complementarias, la explicación más sencilla es que se produjo no disyunción durante alguna mitosis del embrión en desarrollo.

e. Las líneas celulares son normales, lo cual indica que no han ocurrido hechos de no disyunción. La explicación más sencilla es que el segundo cuerpo polar fue fertilizado y se fusionó posteriormente con el embrión en desarrollo.

20. **a.** Los descendientes comunes son $b\ e^+/b\ e$ y $b^-\ e/b\ e$.

b. La hembra rara pudo proceder de un hecho de entrecruzamiento, que habría dado lugar a un gameto $b^-\ e^+$. La hembra rara pudo proceder también de un hecho de no disyunción que resultara en un gameto $b\ e^+/b^+\ e$. Estos gametos podrían dar lugar a descendencia viable.

c. La hembra apareció como resultado de no disyunción.

23. La radiación pudo haber causado mutaciones puntuales o haber inducido recombinación, aunque la no disyunción es la explicación más probable.

27. La aneuploidía se produce por no disyunción. Por lo tanto, servirá cualquier sistema que detecte la no disyunción. Se comenta uno de los más sencillos. Cruce hembras de ojos blancos con machos de ojos rojos y busque en la descendencia un resultado opuesto al esperado para el ligamiento al X. Compare las poblaciones no expuestas a los contaminantes ambientales con las expuestas a los diferentes agentes sospechosos.

Capítulo 19

1. 3, 4, 6.

5. En primer lugar, observe que ha habido conversión génica. En el primer cruzamiento, se convirtió a_1 (1:3). En el segundo cruzamiento, se convirtió a_3. En el tercero, a_3. Existe una polaridad bastante obvia. Los resultados se pueden explicar con el mapa siguiente, donde el DNA híbrido sólo entra desde la izquierda.

$$a_3 \text{ —— } a_1 \text{ —— } a_2$$

7. Las proporciones son 3:1, tanto para a_1 como para a_2. No hay indicios de polaridad, lo que indica que está ocurriendo conversión génica como parte del proceso de recombinación. La mejor explicación es que sucedieron dos hechos independientes de reparación por escisión y que, en ambos casos, la reparación retuvo el alelo mutante y no el silvestre.

8. **a.** y **b.** Un heterodúplice que contiene varias bases distintas en las dos cadenas sufre una distorsión mayor que la de otro que contiene un simple emparejamiento erróneo. Por lo tanto, es más probable que se repare el primero de ellos. En tal caso, se reparan ambas moléculas del heterodúplice (dando lugar a proporciones 6:2 y 2:6) más a menudo que una (proporciones 5:3 ó 3:5) o ninguna (proporción 3:1:1:3). La preferencia en la dirección (esto es, la adición de una base en lugar de su deleción) es análoga a la reparación de los dímeros de timina. En este último caso, los nucleótidos desapareados se consideran correctos y es la cadena con el dímero de timina la que se repara por escisión.

Un emparejamiento erróneo escapa a la reparación más veces de las que se repara, produciendo un asca del tipo 3:1:1:3.

Las mutaciones por transición no provocan una distorsión tan grande de la hélice, y cada una de las cadenas del heterodúplice tendría la misma probabilidad de ser reparada. Esto llevaría a proporciones 4:4 (dos reparaciones en direcciones opuestas), 5:3 (una reparación), 3:1:1:3 (sin reparación o dos reparaciones en direcciones opuestas) y, menos frecuentemente, 6:2 (dos reparaciones en la misma dirección).

c. Como la reparación por escisión elimina la cadena opuesta al bucle grande (es decir, la opuesta a la mutación de cambio de fase), se mantiene también la mutación por transición situada en *cis*. Los genes cercanos sufrirán conversión génica debido a la longitud del tramo sometido a reparación por escisión.

9. **(a)** 6:2 = 31.25 %; **(b)** 2:6 = 5 %; **(c)** 3:1:1:3 = 11.25 %; **(d)** 5:3 = 37.5 %; **(e)** 3:5 = 15 %.

Capítulo 20

1. Los plásmidos R son los principales portadores de genes de resistencia a fármacos. Adquieren estos genes mediante la transposición de los que están situados entre secuencias IR (repeticiones invertidas). Una vez insertado en un plásmido, el transposón que confiere la resistencia a un fármaco puede transferirse por conjugación, si se mantiene en el plásmido R, o puede insertarse en el cromosoma del hospedador.

4. Boeke, Fink y colaboradores demostraron que la transposición del elemento *Ty* de levadura requiere un intermediario de RNA. Construyeron un plásmido utilizando un elemento *Ty* que tenía un promotor que podía activarse con galactosa y un intrón insertado en la región estructural. En primer lugar, la frecuencia de transposición mostró un gran incremento tras la adición de la galactosa, lo cual indica que el incremento en la transcripción (y producción de RNA) correlacionaba con las frecuencias de transposición. Aún más importante, después de la transposición, encontraron que el DNA de *Ty* recién insertado carecía de la secuencia del intrón. Como la eliminación de los intrones tiene lugar sólo durante la maduración del RNA, debe haber un intermediario de RNA implicado en el hecho de transposición.

5. Los elementos *P* son transposones de *Drosophila*. En ciertas condiciones, presentan una elevada frecuencia de transposición y se pueden emplear para producir nuevas mutaciones mediante inserción aleatoria e interrupción génica. Como tales, constituyen una valiosa herramienta para señalizar los genes y facilitar su clonación molecular. (Véase el Problema 15 del Cap. 13 para más información sobre la clonación mediante la utilización de etiquetas inserccionales). Los elementos *P* también se pueden manipular para utilizarlos en la inserción de casi cualquier DNA (o gen) en el genoma de *Drosophila*. La transferencia génica mediada por elementos *P* funciona mediante la inserción del DNA de interés entre las repeticiones invertidas necesarias para la transposición del elemento *P*; la inyección de este DNA recombinante, junto al DNA de un elemento *P* intacto (que proporciona la transposasa), en embriones muy tempranos, y la búsqueda de inserciones (aleatorias) entre la descendencia de la mosca inyectada.

7. La mejor explicación es que la mutación se debe a la inserción de un elemento transponible.

8. a. y **b.** La bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens* contiene un gran plásmido denominado plásmido Ti (inductor de tumor). Cuando esta bacteria infecta a una planta, se transfiere una región del plásmido denominada T-DNA y se inserta aleatoriamente en el genoma de la planta. El T-DNA dirige la síntesis de fitohormonas que causan un crecimiento incontrolado (un tumor), así como de compuestos llamados opinas. (Estos compuestos no pueden ser metabolizados por la planta pero sí son utilizados por la bacteria).

Cuando se cultiva un fragmento de tejido «normal» de la planta con los nutrientes y hormonas del crecimiento apropiados, se estimula la división de las células de manera desorganizada, formándose una masa de células indiferenciadas denominada callo. Estas células se diferenciarán únicamente en tallos (o raíces) si se ajustan de manera cuidadosa los niveles de hormonas vegetales. El T-DNA produce crecimiento indiferenciado porque dirige la síntesis no equilibrada de estas mismas hormonas. El hecho de que algunos cultivos infectados produjeran tallos sugiere que estas células «perdieron» la capacidad de producir elevados niveles de hormonas vegetales. Esto estaría de acuerdo con la pérdida del T-DNA (similar a la pérdida de otros elementos transponibles que se observa en muchas especies). Por lo tanto, el injerto A crecería normalmente y las semillas producidas a partir de él no tendrían rastros del T-DNA. El hecho de que las células del injerto A crezcan en el medio sintético como las células de los tumores sugiere que el medio aporta los niveles elevados de fitohormonas que se requieren para el crecimiento indiferenciado, incluso en ausencia del T-DNA.

Capítulo 21

3. La herencia materna de los cloroplastos da como resultado la variegación en el color verde-blanco observada en *Mirabilis*.

Cruzamiento 1: hembra variegada × macho verde ⟶ descendencia variegada
Cruzamiento 2: hembra verde × macho variegado ⟶ descendencia verde

5. Ambas levaduras progenitoras contribuyen con sus mitocondrias al citoplasma de la célula diploide resultante. La meiosis posterior muestra herencia uniparental para las mitocondrias. Por lo tanto, se observarán ascas 4:0 y 0:4.

7. Los determinantes genéticos de R y S son citoplásmicos y muestran herencia materna.

9. Ambas levaduras progenitoras contribuyen con sus mitocondrias al citoplasma de la célula diploide resultante. En estos heteroplasmontes puede haber recombinación del mtDNA, aunque la segregación citoplásmica da lugar a tétradas que contienen o bien uno de los genotipos de mtDNA parental o bien uno de los tipos recombinantes recíprocos.

$oli^R\ cap^R$	o	$oli^S\ cap^S$	o	$oli^R\ cap^S$	o	$oli^S\ cap^R$
$oli^R\ cap^R$		$oli^S\ cap^S$		$oli^R\ cap^S$		$oli^S\ cap^R$
$oli^R\ cap^R$		$oli^S\ cap^S$		$oli^R\ cap^S$		$oli^S\ cap^R$
$oli^R\ cap^R$		$oli^S\ cap^S$		$oli^R\ cap^S$		$oli^S\ cap^R$

11. Si la mutación está en el cloroplasto, los cruzamientos recíprocos darán resultados distintos; mientras que si está en el núcleo y es dominante, los cruzamientos recíprocos darán el mismo resultado.

13. Tras el cruzamiento inicial, una serie de retrocruzamientos con polen de la planta B dará lugar a la combinación deseada de citoplasma A y núcleo B. En cada cruzamiento, la hembra aporta todo el citoplasma y la mitad del contenido nuclear, mientras que el macho contribuye con la mitad del contenido nuclear.

16. Una posible explicación es que los mutantes son heteroplasmontes y contienen DNA de los orgánulos silvestre (*sm-s*) y mutante (*sm-r*). Las divisiones mitóticas posteriores pueden dar lugar a segregación citoplásmica, de manera que una célula hija contenga únicamente un tipo de DNA del orgánulo.

17. El fenotipo rojo del heterocarionte indica que el fenotipo rojo está producido por el alelo de un orgánulo citoplásmico.

21. a. y **b.** Cada una de las meiosis muestra herencia uniparental, lo que sugiere la existencia de herencia citoplásmica.

c. Como ant^R es probablemente mitocondrial y se ha demostrado que los petites se deben a deleciones en el DNA mitocondrial, ant^R puede haberse perdido en algunos petites.

23. Algunas tétradas serán como la estirpe 1, algunas como la estirpe 2 y algunas serán recombinantes.

24. a. No; en la levadura de panadería, toda la descendencia recibe un tipo de mtDNA. Probablemente se trata de un plásmido o un episoma.

b. Tres bandas, una de 2 μ y otras dos cuya suma hace 2 μ.

26. En primer lugar, se hace un mapa de restricción del mtDNA utilizando varias enzimas de restricción. Teniendo en cuenta una probable conservación evolutiva, un experimento de hibridación empleando la técnica de Southern detectará fragmentos de levadura u otro organismo equivalentes a segmentos en los que ya se hayan identificado genes.

Capítulo 22

3. a. Dominante. La expresión incorrecta de FasL a partir de un alelo mutante sería dominante sobre la expresión del alelo FasL silvestre. En este caso, cada célula del hígado enviaría la señal de apoptosis a sus células vecinas.

b. No. El mutante provocaría un exceso de muerte celular, no de proliferación.

4.
1. Ciertos cánceres se heredan como caracteres mendelianos simples con gran penetrancia.
2. La mayoría de los agentes carcinogénicos son también mutagénicos.
3. Se han aislado varios oncogenes de virus que causan tumores.
4. Se han cartografiado, aislado y estudiado muchos genes que producen susceptibilidad a tipos concretos de cánceres.
5. Se han aislado oncogenes dominantes a partir de células tumorales.
6. Ciertos cánceres muestran una correlación muy fuerte con reorganizaciones cromosómicas concretas.

6. La inhibición de la apoptosis puede contribuir a la formación de un tumor al permitir que las células tengan un período de vida anormalmente largo, lo que facilita la acumulación de mutaciones que conducen al cáncer. Además, se inhibiría la función normal de la apoptosis de eliminación de las células anormales y, mediante la proteína p53, de aquellas células que tienen el DNA «dañado».

9. La proteína p53 detecta el DNA dañado y es activada por éste. Al ser activada, p53 activa a la proteína p21, un inhibidor del complejo ciclina-CDK necesario para la progresión del ciclo celular. Si se repara el DNA dañado, el sistema acabará por desactivar p53 y permitir la división celular. Sin embargo, si el daño no se puede reparar, p53 permanecerá activa y estimulará la ruta de apoptosis, produciendo en última instancia la muerte celular. Por esta razón, la «pérdida» de p53 va asociada a menudo al cáncer.

Capítulo 23

3. En la especie humana, una sola copia del cromosoma Y es suficiente para desviar el desarrollo hacia la ruta normal que conduce al fenotipo de varón. La copia extra del cromosoma X es simplemente inactivada. Más que depender de niveles de concentración, ambos mecanismos parecen ser del tipo «todo o nada».

5. La concentración de *Sxl* es crucial para el desarrollo de las hembras y dispensable para el de los machos. Las mutaciones Sxl^M, dominantes y letales para los machos, no matan en realidad a todos los machos, sino que producen simplemente un exceso de producto, de manera que sólo aparecen hembras (XX y XY fértiles). Las reversiones pueden eliminar todo el producto génico, dando lugar a machos XX (estériles) y XY. Las reversiones serían recesivas porque, probablemente, una única copia del gen pueda generar suficiente producto génico para «bloquear» el interruptor en la posición que conduce al desarrollo femenino.

7. a. Los resultados sugieren que ABa y ABp no están determinadas en este momento de su desarrollo. La futura determinación y diferenciación de estas células depende de su posición en el organismo en desarrollo.

b. Como la ausencia de las células EMS provoca la falta de determinación y diferenciación de las células AB, las células EMS deben ser responsables, al menos en parte, del desarrollo de las células AB, ya sea por contacto directo o por la producción de una sustancia difusible.

c. La mayoría de las células descendientes de AB no se convierten en células musculares cuando está presente P2, y sí se convierten en células musculares cuando no hay P2. Por lo tanto, P2 debe impedir que algunas células descendientes de AB se transformen en células musculares.

12. La expresión adecuada de las bandas cuarta y quinta de *ftz* requiere *Kr*, y *kni* la de las bandas quinta y sexta.

15. El eje anteroposterior estaría invertido.

Capítulo 24

1. Selección, mutación, migración, consanguinidad y deriva genética.

2. $A1 = 0.57$, $A2 = 0.43$.

4. 0.65.

6. **a.** $p = [406 + 1/2(744)]/1482 = 0.52$, $q = [332 + 1/2(744)]/1482 = 0.48$. Si la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg, los genotipos se distribuyen de la siguiente forma:

$L^M/L^M = p^2(1482) = 401$ Observado: 406
$L^M/L^N = 2pq(1482) = 740$ Observado: 744
$L^N/L^N = 2\ q^2(1482) = 341$ Observado: 332

La población está en equilibrio.

b. Si los cruzamientos se producen al azar respecto del tipo sanguíneo, los cruzamientos deben aparecer con las frecuencias siguientes:

$L^M/L^M \times L^M/L^M = (p^2)(p^2)(741) = 54$ Observado: 58
$L^M/L^M \times L^M/L^N$ o $L^M/L^N \times L^M/L^M = (2)(p^2)(2pq)(741) = 200$ Observado: 202
$L^M/L^N \times L^M/L^N = (2pq)(2pq)(741) = 185$ Observado: 190
$L^M/L^M \times L^N/L^N$ o $L^N/L^N \times L^M/L^M = (2)(p^2)(q^2)(741) = 92$ Observado: 88
$L^M/L^N \times L^N/L^N$ o $L^N/L^N \times L^M/L^N = (2)(2pq)(q^2)(741) = 170$ Observado: 162
$L^N/L^N \times L^N/L^N = (q^2)(q^2)(741) = 39$ Observado: 41

Los cruzamientos son al azar respecto del grupo sanguíneo.

7. **a.** y **b.**

Población	p	q	¿Equilibrio?
1	1.0	0.0	sí
2	0.5	0.5	no
3	0.0	1.0	sí
4	0.625	0.375	no
5	0.3775	0.625	no
6	0.5	0.5	sí
7	0.5	0.5	no
8	0.2	0.8	sí
9	0.8	0.2	sí
10	0.993	0.007	sí

c. 0.898.

d. $p = 0.56$, $q = 0.44$.

9. La frecuencia de un fenotipo en una población es una función de la frecuencia en la población de los alelos que producen ese fenotipo. Realice cruzamientos mendelianos para establecer la dominancia y la recesividad.

11. Los alelos silvestres son normalmente dominantes porque la mayoría de las mutaciones dan lugar a la disminución o eliminación de la función. Para ser dominante, el heterocigoto debe mostrar aproximadamente el mismo fenotipo que el homocigoto dominante. Esto será así sólo cuando el alelo silvestre genere un producto funcional y el alelo mutante no.

Las reorganizaciones cromosómicas son a menudo mutaciones dominantes porque causan grandes cambios en la regulación génica o dan lugar incluso a la fusión de varios productos génicos. Mutaciones dominantes típicas causan la generación de actividades nuevas, la producción de niveles excesivamente elevados de los productos génicos, etc.

14. Una posibilidad es que los albinos fueran considerados afortunados y tuvieran más posibilidades para cruzarse que los no albinos. También podrían haber sido alentados a cruzarse entre sí. Alternativamente, en las tribus con muy baja frecuencia de albinos, éstos pueden haber sido considerados muy desafortunados, eliminándolos al nacer o impidiendo que se cruzaran.

17. **(a)** 0.528; **(b)** 0.75.

18. 0.01.

20. 6.5.

Capítulo 25

2. **a.** Longitud de la pata: $H^2 = 0.200$ $h^2 = 0.150$
Longitud del cuello: $H^2 = 0.600$ $h^2 = 0.010$
Contenido en grasa: $H^2 = 0.500$ $h^2 = 0.400$

b. El contenido en grasa respondería mejor a la selección.

c. 8.9 %.

3. **a.** p(homocigoto en un locus) $= 3(\frac{1}{2})^3 = \frac{3}{8}$
p(homocigoto para dos loci) $= 3(\frac{1}{2})^3 = \frac{3}{8}$
p(homocigoto para tres loci) $= (\frac{1}{2})^3 = \frac{1}{8}$

b. p(0 letras mayúsculas) $= \frac{1}{64}$ p(4 letras mayúsculas) $= \frac{15}{64}$
p(1 letra mayúscula) $= \frac{3}{32}$ p(5 letras mayúsculas) $= \frac{3}{32}$
p(2 letras mayúsculas) $= \frac{15}{64}$ p(6 letras mayúsculas) $= \frac{1}{64}$
p(3 letras mayúsculas) $= \frac{10}{32}$

5. La población descrita se distribuiría de la forma siguiente:

tres cerdas $\frac{27}{64}$
dos cerdas $\frac{36}{64}$
una cerda $\frac{1}{64}$

Observe que la clase de tres cerdas incluye 7 genotipos distintos, la de dos cerdas 19 genotipos distintos y la de una cerda únicamente 1 genotipo. Sería muy difícil determinar la situación genotípica subyacente mediante cruzamientos controlados y análisis de las frecuencias de los descendientes.

7. Media = 4.7
Varianza = 0.2619
Desviación típica = 0.5117

9. **a.** H^2 tiene sentido sólo respecto a la población estudiada y en el ambiente en el que ha sido estudiada. De otra forma, carece de sentido.

b. Ni H^2 ni h^2 son una medida fiable que pueda utilizarse para generalizar desde una muestra particular al «universo» de la población humana. Ciertamente, no deberían emplearse en la toma de decisiones sociales (del tipo de las implicadas en los términos *eugenesia* y *disgenesia*).

c. De nuevo, H^2 y h^2 no son medidas fiables y no deberían emplearse en ninguna toma de decisión que afecte a problemas sociales.

11. En primer lugar, defina el *alcoholismo* en términos de conducta. Luego, dese cuenta de que todas las observaciones deben limitarse a la conducta establecida en la definición y que todas las conclusiones de sus observaciones sólo son aplicables a dicha conducta. Para obtener sus datos, debe trabajar con una población en la que pueda distinguir entre incidencia familiar y herencia. Esto significa, en términos prácticos, que la población debe estar formada por individuos que estén genéticamente emparentados, pero que se hayan criado en todos los ambientes posibles.

14. **a.** Si asume que todos los individuos del extremo de cualquier espectro son homocigotos, entonces sus descendientes tienen mayor probabilidad de ser heterocigotos que los individuos originales. Es decir, estarán más próximos a la media.

b. En los datos de Galton, la regresión es una estimación de la heredabilidad (h^2), suponiendo que hubo pocas diferencias ambientales entre los padres y los hijos.

Capítulo 26

2. Los tres principales son: (1) los organismos varían entre sí dentro de una especie, (2) la variación es heredable y (3) diferentes tipos dan lugar a números distintos de descendientes en las futuras generaciones.

4. Una población no se diferenciará de otras poblaciones por consanguinidad local si:

$$\mu 1 \geq 1/N$$

así

$$N1 \geq 1/\mu$$

$$N \geq 10^5$$

7. La aptitud media de la población 1 [$p(A) = 0.8$, $p(B) = 0.9$] es 0.92. La aptitud media de la población 2 [$p(A) = 0.2$, $p(B) = 0.2$] es 0.73. Como la selección actúa incrementando la aptitud media, las frecuencias de A y de B deberían aumentar en la siguiente generación. Hay un pico adaptativo sencillo en $A/A \cdot B/B$. Mediante inspección, la aptitud es menor en $a/a \cdot b/b$ y mayor en $A/A \cdot B/B$. La frecuencia alélica en el pico es 1 tanto para A como para B.

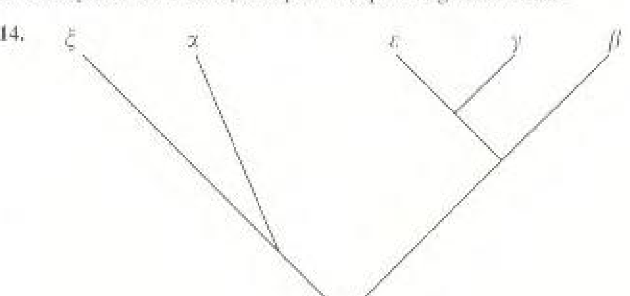
10. Las familias génicas α y β muestran una similitud notable en la secuencia de aminoácidos (véase el Cuadro 26-4 del texto). Las similitudes de secuencia son mayores dentro de cada familia génica y, en algunos casos, genes que pertenecen a la misma familia génica tienen estructuras intrón-exón idénticas.

12. Una raza geográfica es una población que se distingue genéticamente de otras poblaciones locales, pero es capaz de intercambiar genes con los miembros de otras poblaciones locales.

Una especie es un grupo de organismos que intercambian genes entre los miembros del grupo, pero no lo hacen con los miembros de otros grupos.

Las poblaciones que están separadas geográficamente divergirán la una de la otra como consecuencia de una combinación de mutaciones únicas, selección y deriva genética. Para que las poblaciones diverjan lo suficiente como para quedar aisladas reproductivamente, se requiere normalmente una separación espacial suficiente que impida cualquier migración eficaz.

14.





9 788448 603687

McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U.

A Subsidiary of The **McGraw-Hill** *Companies*

ISBN: 84-486-0368-0